



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E  
BIOPROCESSOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Validação de método espectrofotométrico UV-VIS e  
espectrofluorimétrico para determinação de corante vermelho de origem  
biotecnológica associado a nanocarreadores**

Emiliane Rodrigues de Araújo

Araraquara

2019

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E  
BIOPROCESSOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**“Validação de método espectrofotométrico UV-VIS e  
espectrofluorimétrico para determinação de corante vermelho  
de origem biotecnológica associado a nanocarreadores”**

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, para obtenção do Título de Mestra em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, na área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

**Orientada:** Emiliane Rodrigues de Araújo

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Araraquara

2019

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**A663v**

Araújo, Emiliane Rodrigues de.

Validação de método espectrofotométrico UV-VIS e espectrofluorimétrico para determinação de corante vermelho de origem biotecnológica associado a nanocarreadores / Emiliane Rodrigues de Araújo. – Araraquara, 2019.  
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Concentração: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

1. Corantes. 2. Validação de Métodos. 3. Métodos Espectroanalíticos. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.

**CAPES: 33004030170P0**

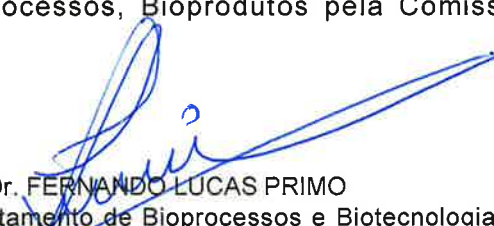
## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Validação de método espectrofotométrico UV-VIS e espectrofluorimétrico para determinação de corante vermelho de origem biotecnológica associado a nanocarreadores

**AUTORA: EMILIANE RODRIGUES DE ARAUJO**

**ORIENTADOR: FERNANDO LUCAS PRIMO**

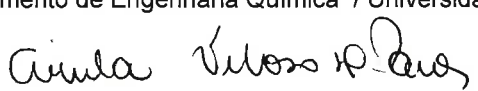
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS (MESTRADO PROFISSIONAL), área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO  
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP



Prof. Dr. ALBERTO COLLI BADINO JUNIOR  
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR



Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA  
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Araraquara, 15 de fevereiro de 2019

# *Dedicatória*

A Deus, pelo dom da vida e saúde para alcançar  
todos os meus objetivos e sonhos.

Aos meus pais Isaiás e Angélica, por todo o  
ensinamento e educação, sem o amor de vocês  
eu nada seria.

Ao meu irmão Rauny, pela amizade e força  
mesmo com a distância, você é meu melhor  
presente.

Ao meu grande amor Samuel, pela paciência e  
compreensão durante esta trajetória e por todo  
carinho nos momentos mais difíceis.

A toda minha família, por todo o incentivo não só  
nesta, mas em todas as etapas da minha vida.

# *Agradecimentos*

Ao Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, pelos ensinamentos compartilhados, a dedicação e a confiança no meu trabalho.

Às amigas Camila e Luciana pela amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório pela convivência e respeito.

Aos docentes e funcionários da FCFar/UNESP e do Departamento de Bioprocessos Biotecnologia.

# *Epigrafe*

“O período de maior ganho  
em conhecimento e  
experiência é o período mais  
difícil na vida de alguém”.

Dalai Lama

## RESUMO

O controle da qualidade dos resultados de análises químicas tem sido cada vez mais exigido devido ao grande prejuízo que dados analíticos não confiáveis podem gerar, principalmente quando se diz respeito à segurança do produto, e às consequências financeiras irreversíveis que pode causar. Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos durante as etapas analíticas é necessário que o método empregado seja validado. Neste contexto, o presente trabalho visa desenvolver e validar um método espectroanalítico para determinação de corantes vermelho e derivados livre e nanoencapsulado, por espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis, como métodos alternativos aos cromatográficos tradicionais. A partir da espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-visível utilizando-se o espectrofotômetro modelo Genesys 10s da *Thermo Scientific* e espectrofluorímetro Shimadzu RF6000 desenvolveu-se um protocolo experimental para determinação da curva de correlação entre máximo de emissão de absorção e emissão de fluorescência em função de diferentes concentrações de quinizarina. O método foi determinado com número de repetição ( $n$ ) igual a 3. Os parâmetros de aquisição dos espectros de fluorescência foram fixados com um comprimento de onda de excitação igual a 480 nm, fendas de excitação e emissão igual a 10/10 nm, respectivamente, com emissão na faixa de 520 a 680 nm. As amostras foram preparadas com auxílio de uma micropipeta (10,0 uL *Eppendorf*) a partir de diluição infinita em acetonitrila (2,0mL), diretamente em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, partindo-se de uma solução inicial da quinizarina 1,00 mg/mL em dimetil-sulfóxido. Os métodos apresentaram linearidade na faixa de 1,00 a 12,00  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 0,0433[\text{quinizarina}, \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0,0019$ ,  $r^2 = 0,9999$  para espectroscopia de absorção, e de 5,00 a 12,00  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 31152[\text{quinizarina}, \mu\text{g.mL}^{-1}] + 91994$ ,  $r^2 = 0,9964$  para espectrofluorimetria. O teste ANOVA demonstrou que as equações da reta são estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), e o modelo linear é adequado para o método analítico. O valores de limites de detecção (LD) foram de 0,15 e 1,35  $\mu\text{g/mL}$  e o limite de quantificação (LQ) de 0,47 e 4,10  $\mu\text{g/mL}$  para absorção e fluorescência, respectivamente. Assim, foi possível estabelecer uma relação linear que permitiu a determinação da inclinação e equação da reta a partir dos pontos experimentais. Os métodos apresentaram desvio padrão relativo (DPR) menor que 5% para os parâmetros de precisão, recuperação dentro da faixa de 95 a 105% e nenhuma interferência dos compostos da matriz, logo, foram considerados precisos, exatos e seletivos. Através do estudo de validação, realizado conforme preconizado pela RDC 166/2017, foi possível comprovar a adequabilidade dos métodos espectro-analíticos para quantificação de quinizarina e corantes vermelhos derivados.

**Palavras-chave:** Corantes. Validação de Métodos. Métodos Espectroanalíticos.

## ABSTRACT

Quality control of chemical analysis results has been increasingly required because of the great harm that unreliable analytical data can generate, especially when it comes to product safety, and the irreversible financial consequences it can cause. To guarantee the reliability of the results obtained during the analytical steps it is necessary that the method employed be validated. In this context, the present work aims to develop and validate a spectroanalytical method for the determination of red dyes and free and nanoencapsulated derivatives, by absorption spectroscopy and UV-Vis fluorescence emission, as alternative methods to traditional chromatographic methods. UV-visible fluorescence emission and absorption spectroscopy using the Genesys 10s spectrophotometer from Thermo Scientific and Shimadzu RF6000 spectrofluorimeter was developed an experimental protocol for determination of the correlation curve between maximum emission of absorption and emission of fluorescence as a function of different concentrations of quinizarin. The method was determined with repeat number (n) equal to 3. The acquisition parameters of the fluorescence spectra were set with an excitation wavelength equal to 480 nm, excitation and emission slots equal to 10/10 nm, respectively, with emission in the range of 520 to 680 nm. The samples were prepared using a micropipette (10.0  $\mu$ L Eppendorf) from infinite dilution in acetonitrile (2.0 mL), directly into a 10 mm optical path quartz cuvette, starting with an initial solution of quinizarin 1.00 mg / mL in dimethylsulfoxide. The methods showed linearity in the range of 1.00 to 12.00  $\mu$ g / mL ( $y = 0.0433$  [quinizarin,  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>] + 0.0019,  $r^2 = 0.9999$  for absorption spectroscopy, and 5, 00 to 12.00  $\mu$ g / mL ( $y = 31152$  [quinizarine,  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>] + 91994,  $r^2 = 0.9964$  for spectrofluorimetry). The ANOVA test showed that the equations of the line are statistically significant ( $p < 0.05$ ), and the linear model is suitable for the analytical method. The limits of detection (LD) were 0.15 and 1.35  $\mu$ g / mL and the limit of quantification (LQ) of 0.47 and 4.10  $\mu$ g / mL for absorption and fluorescence, respectively. Thus, it was possible to establish a linear relationship that allowed the determination of slope and equation of the line from the experimental points. The methods showed a relative standard deviation (DPR) of less than 5% for precision parameters, recovery within the range of 95 to 105% and no interference of matrix compounds were therefore considered accurate, accurate and selective. Through the validation study, performed according to RDC 166/2017, it was possible to prove the suitability of the spectroanalytical methods for the quantification of quinizarine and derived red dyes.

**Key-words:** Dyes. Validation of Methods. Spectroanalytical Methods.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de grupos cromóforos presentes em corantes orgânicos. ....	17
Figura 2 - Estrutura química geral das antraquinonas. ....	19
Figura 3 - Estrutura química da quinizarina (QZN).....	21
Figura 4 - Estruturas tautoméricas da quinizarina .....	22
Figura 5 - Esquema ilustrativo com as principais estruturas poliméricas utilizadas como sistemas nanocarreadores de fármacos .....	24
Figura 6 - Esquema de um espectrofotômetro .....	28
Figura 7 - Esquema de um espectrofluorímetro.....	29
Figura 8 - Esquema do conceito de exatidão. ....	34
Figura 9 – Esquema comparativo entre os conceitos de precisão e exatidão. ....	36
Figura 10 – Imagem do esquema com reatores camisados utilizados no preparo das formulações.....	38
Figura 11 – Imagem do preparo da nanocápsulas contendo o corante sintético quinizarina. ....	38
Figura 12 - Espectro de absorção no UV/VIS da QZN/Acetonitrila (---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10µg/mL.....	43
Figura 13 - Espectro de absorção normalizada UV/VIS da QZN/Acetonitrila (---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10µg/mL. ....	43
Figura 14 - Espectro de emissão de fluorescência UV/VIS da QZN/Acetonitrila (---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10µg/mL, com comprimento de excitação de 480 nm para ambos e fendas de 10,0/10,0 nm para excitação e emissão, respectivamente. ....	44
Figura 15 - Espectro de emissão de fluorescência normalizada UV/VIS da QZN/Acetonitrila(---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10µg/mL, com comprimento de excitação de 480 nm para ambos e fendas de 10,0/10,0 nm para excitação e emissão, respectivamente.....	44
Figura 16 - Conjunto de espectros de absorção no UV-VIS do corante QZN em solução de acetonitrila em diferentes concentrações (1,0 µg/mL – 12 µg/mL). ....	48
Figura 17 - Curva de correlação entre absorção máxima em função da concentração de quinizarina na faixa de 1,0 µg/mL a 12 µg/mL (n=3). ....	48
Figura 18 - Conjunto de espectros de emissão de fluorescência no UV-VIS do corante QZN em solução de acetonitrila em diferentes concentrações (5,0 µg/mL – 12 µg/mL). ....	49
Figura 19 - Curva de correlação entre absorção máxima em função da concentração de quinizarina na faixa de 5,0 µg/mL a 12 µg/mL (n=3). ....	49
Figura 20 – Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofotométrico. ...	54
Figura 21 – Gráfico dos resíduos studentizados para o método espectrofotométrico. .	55
Figura 22 – Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofluorimétrico. 55	
Figura 23 – Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofluorimétrico. 56	
Figura 24 – Resumo gráfico das análises de resíduos para o método espectrofotométrico. ....	57
Figura 25 – Resumo gráfico das análises de resíduos para o método espectrofluorimétrico. ....	58

Figura 26 – Gráfico da análise de pontos influentes DFFITS para o método espectrofotométrico. ....	59
Figura 27 – Gráfico da análise de pontos influentes D-COOK para o método espectrofotométrico. ....	60
Figura 28 – Gráfico da análise de pontos influentes DFBETA para o método espectrofotométrico. ....	60
Figura 29 – Gráfico da análise de pontos influentes DFFITS para o método espectrofluorimétrico. ....	61
Figura 30 – Gráfico da análise de pontos influentes D-COOK para o método espectrofluorimétrico. ....	62
Figura 31 – Gráfico da análise de pontos influentes DFBETA para o método espectrofluorimétrico. ....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimento de onda de absorção de luz <i>versus</i> cor de corantes orgânicos. ....	18
Tabela 2 - Substituintes de 5 compostos derivados de antraquinona: antraquinona, emodina, parietina, catenarina e reno. ....	19
Tabela 3 - Atribuição de fonte natural e índice de cor de alguns corantes de antraquinona. ....	20
Tabela 4 - Faixas de comprimento de onda de interesse para a espectrofotometria. ...	26
Tabela 5 – Tamanho de partícula e potencial Zeta para as nanocápsulas na presença e ausência do corante quinizarina (QZN).....	47
Tabela 6 – Tabela ANOVA para o método espectrofotométrico. ....	50
Tabela 7 – Tabela ANOVA para o método espectrofotométrico. ....	51
Tabela 8 – Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto para o método espectrofotométrico. ....	51
Tabela 9 – Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto para o método espectrofluorimétrico. ....	51
Tabela 10 – Avaliação da homocedasticidade. ....	52
Tabela 11 – Teste de normalidade para o método espectrofotométrico. ....	53
Tabela 12 – Teste de normalidade para o método espectrofluorimétrico. ....	54
Tabela 13 – Avaliação da independência pelo teste de Durbin-Watson. ....	56
Tabela 14 – Critérios de Análise dos pontos influentes DFFITS, DCOOK e DFBETA. ....	59
Tabela 15 – Análise dos pontos influentes DFFITS. ....	61
Tabela 16 – Análise dos pontos influentes D-COOK. ....	61
Tabela 17 – Análise dos pontos influentes DFBETA. ....	61
Tabela 18 – Análise dos pontos influentes DFFITS para o método espectrofluorimétrico. ....	63
Tabela 19 – Análise dos pontos influentes D-COOK para o método espectrofluorimétrico. ....	63
Tabela 20 – Análise dos pontos influentes DFBETA para o método espectrofluorimétrico. ....	63
Tabela 21 - Estudo de seletividade para os métodos espectrofotométricos (EFO) e espectrofluorimétrico (EFU).....	64
Tabela 22 - Resultados para a determinação da exatidão do método espectrofluorimétrico e espectrofotométrico. ....	65
Tabela 23 - Resultados para a determinação da precisão do método espectrofluorimétrico. ....	66
Tabela 24 - Resultados para a determinação da precisão do método espectrofotométrico. ....	66

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$r$	Coeficiente de correlação
$r^2$	Coeficiente de determinação
$\pi$	Nível
$\pi - \pi^*$	Transição eletrônica do estado fundamental para o estado excitado em alcenos, compostos carbonílicos, alcinos, compostos azo e outros
$n - \pi^*$	Transição eletrônica do estado fundamental para o estado excitado em compostos carbonílicos
S1	Estado singlete excitado
T1	Estado triplete excitado
$\xi$	Potencial zeta
$\epsilon$	Coeficiente de absorvidade molar
$\Phi_f$	Rendimento quântico de fluorescência
$\lambda$	Comprimento de onda de radiação eletromagnética
CV	Corante vermelho de origem biotecnológica
QZN	Corante sintético quinizarina
ANOVA	Análise de Variância
ACN	Acetonitrila
DMSO	Dimetil-sulfóxido
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
GMP	Good Manufacturing Practices
BPF's	Boas Práticas de Fabricação
ICH	International Conference on Harmonisation
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
DO	Densidade óptica ou absorbância
NC	Nanocápsula
RPM	Rotação por minuto
USP	United States Pharmacopeia
DPR	Desvio Padrão Relativo

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1.	CORANTES E PIGMENTOS.....	16
3.2.	ANTRAQUINONAS.....	18
3.3.	QUINIZARINA.....	21
3.4.	NANOTECNOLOGIA.....	22
3.4.1	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	23
3.5.	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	26
3.5.1.	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS.....	26
3.5.2.	ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA.....	28
3.6.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1.	MATERIAIS.....	36
4.2.	EQUIPAMENTOS.....	37
4.3.	MÉTODOS.....	37
4.3.1.	OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	37
4.3.2.	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOCAPSULA DE QUINIZARINA.....	37
4.3.2.1.	PROTOCOLO DE PREPARO DA NANOCÁPSULA POLIMÉRICA CONTENDO QUINIZARINA.....	37
4.3.2.2.	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA.....	39
4.3.3.	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	39
4.3.3.1.	LINEARIDADE DO CORANTE QUINIZARINA.....	39
4.3.3.2.	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	40
4.3.3.3.	SELETIVIDADE.....	40
4.3.3.4.	EXATIDÃO.....	41
4.3.3.5.	PRECISÃO.....	41
4.3.4.	RENDIMENTO EXPERIMENTAL DA ASSOCIAÇÃO DO CORANTE QUINIZARINA.....	41

5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
5.1.	OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	42
5.2.	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOCÁPSULA DE QUINIZARINA.....	46
5.2.1.	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA .....	46
5.3.	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	47
5.3.1.	LINEARIDADE .....	47
5.3.2.	AJUSTE DO MODELO LINEAR .....	49
5.3.2.1.	ANOVA .....	49
5.3.2.2.	AVALIAÇÃO DO INTERCEPTO .....	51
5.3.2.3.	AVALIAÇÃO DA HOMOCEDASTICIDADE .....	52
5.3.2.4.	DIAGNÓSTICO DOS RESÍDUOS .....	53
5.3.2.5.	TESTE DE SHAPIRO-WILK .....	53
5.3.2.6.	ANÁLISE DOS RESÍDUOS PADRONIZADOS E STUDENTIZADOS .....	54
5.3.2.7.	TESTE DE DURBIN-WATSON.....	56
5.3.2.8.	AVALIAÇÃO DOS PONTOS INFLUENTES.....	58
5.3.3.	LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ) .....	63
5.3.4.	SELETIVIDADE .....	64
5.3.5.	EXATIDÃO .....	64
5.3.6.	PRECISÃO .....	65
5.4.	RENDIMENTO EXPERIMENTAL DE ASSOCIAÇÃO DO CORANTE QUINIZARINA.....	67
6.	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	67
6.1.	CONCLUSÃO .....	67
6.2.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de nanocarreadores para a obtenção de sistemas de liberação controlada visa obter formulações farmacêuticas que proporcionem um direcionamento específico do fármaco por várias vias de administração e que promovam vantagens como proteção do princípio ativo, melhor biodisponibilidade e menor toxicidade, resultando em maior conforto e adesão dos pacientes ao tratamento (BIZERRA; SILVA, 2016).

Os corantes têm demonstrado importantes propriedades farmacêuticas principalmente no diagnóstico e tratamento do câncer (AL-OTAIBI et al, 2017; MACHATOVÁ et al, 2016). Neste contexto, o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Fernando L. Primo do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP *câmpus* de Araraquara, tem trabalhado com o nanoencapsulamento de diversos corantes com aplicação na terapêutica.

Dessa forma, surgiu a necessidade do desenvolvimento de um método analítico para quantificar o corante vermelho de origem biotecnológica associado à nanocarreadores como colaboração ao trabalho de mestrado da aluna Camila F. Amantino. No entanto, o corante vermelho não possui um padrão de referência para a utilização nos ensaios de validação dos métodos desenvolvidos, surgindo, então, a necessidade de selecionar outro corante com propriedades químicas semelhantes, sendo escolhida a substância quinizarina com 96 % de grau de pureza.

Segundo as exigências da ANVISA e em conformidade com a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) 166/2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, todo método utilizado na rotina de controle de qualidade de medicamentos deve ser validado, ou seja, possuir evidências documentadas de que é adequado ao uso a que se destina.

Por essa razão o presente trabalho buscou desenvolver e validar métodos espectroanalíticos por absorção e emissão de fluorescência no UV/VIS para a quantificação de corantes de origem biotecnológica associado à

nanocarreadores, como uma alternativa aos métodos cromatográficos tradicionais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e validar métodos espectroanalíticos para quantificação do corante quinizarina sintético e seus derivados biotecnológicos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Realizar a caracterização espectroscópica do corante vermelho de origem biotecnológica e da quinizarina sintética;
- ii. Desenvolver e validar os métodos espectroanalíticos por absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência para a quantificação do corante quinizarina sintético nanoencapsulado;
- iii. Preparar nanocápsulas poliméricas contendo o corante sintético quinizarina pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, utilizando como polímero o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e com núcleo lipofílico de fosfatidilcolina de soja.
- iv. Caracterizar as formulações quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial Zeta e pH.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. CORANTES E PIGMENTOS**

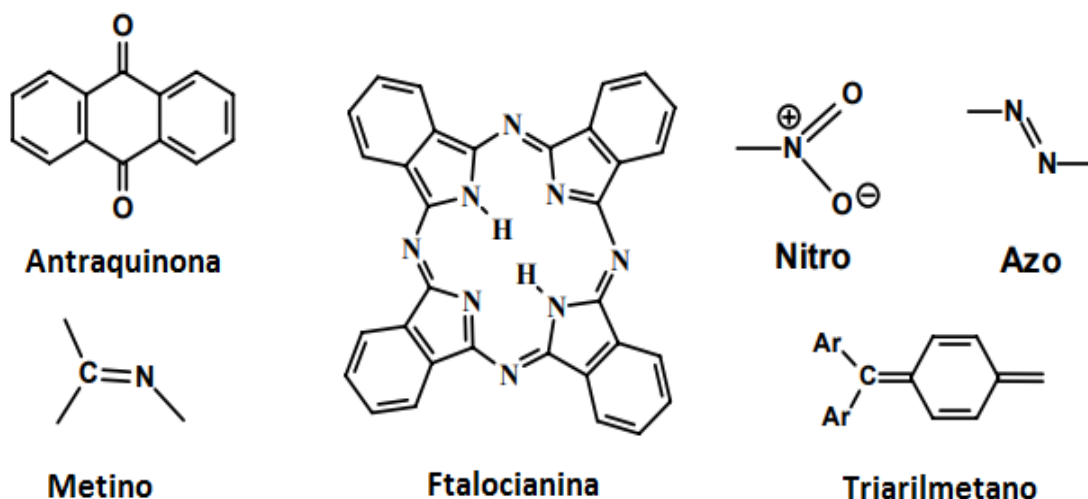
Os termos corantes e pigmentos podem ser facilmente confundidos e empregados como sinônimos. No entanto há diferenças entre eles que necessitam ser abordadas. Ambos, são substâncias químicas adquiridas de fontes naturais ou sintéticas, podem ser de origem orgânica ou inorgânica e são aplicados com o objetivo principal de atribuir cor a diferentes substratos. É exatamente a forma de aplicação que os diferencia (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

De acordo com a ETAD (*The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufactures* - organização internacional que

realiza atividades para investigar os impactos do uso de corantes e pigmentos orgânicos sintéticos no meio ambiente e na saúde), os corantes podem ser solúveis no substrato onde são incorporados ou então ter a sua estrutura cristalina destruída sendo mantidos através de diferentes processos como adsorção, solvatação, ligação iônica ou covalente. No que diz respeito aos pigmentos, estes são insolúveis e não são afetados pelo substrato ao qual foram incorporados (COLOUR INDEX, 2015).

Como principal característica dos corantes e pigmentos destaca-se a habilidade em absorver luz visível (MACHADO, 1999), ou seja, a capacidade da sua estrutura química de possibilitar ressonâncias eletrônicas para absorver radiações eletromagnéticas na região do espectro visível (400-700nm) (SARON; FELISBERTI, 2005). Outras características fundamentais para a presença de cor em uma substância é ter ao menos um grupo cromóforo associado a um sistema conjugado (alternando entre ligações simples e duplas) (IARC, 2010). A Figura 1 apresenta exemplos de grupos cromóforos que podem ser encontrados em corantes.

**Figura 1** - Exemplos de grupos cromóforos presentes em corantes orgânicos.



Fonte: IARC (2010)

Além dos cromóforos, os corantes ainda podem conter em suas estruturas grupos auxocromos e antiauxocromos que colaboram com a diversificação da cor conferida ao corante, conforme demonstrado na Tabela 1. Os auxocromos, ou doadores de elétrons, causam o deslocamento

batocrômico das bandas de absorção do corante, além de contribuir com a solubilidade, enquanto que os grupos antiauxocromos são receptores de elétrons e contribuem no deslocamento da absorção do espectro visível (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

**Tabela 1** - Comprimento de onda de absorção de luz *versus* cor de corantes orgânicos.

Comprimento de Onda de Absorção (nm)	Cor Absorvida	Cor Observada
400-435	Violeta	Amarelo-Verde
435-480	Azul	Amarelo
480-490	Verde-Azul	Laranja
490-500	Azul-Verde	Vermelho
500-560	Verde	Roxo
560-580	Amarelo-Verde	Violeta
580-595	Amarelo	Azul
595-605	Laranja	Verde-Azul
605-700	Vermelho	Azul-Verde

**Fonte:** IARC (2010)

A ampla utilização de corantes naturais provém desde a antiguidade, na confecção de artigos de arte e têxteis, fazendo uso de substâncias naturais coloridas. Os corantes tornaram-se atrativos devido às suas ações anticâncer, antitumoral e antioxidante (MACHATOVÁ et al., 2016).

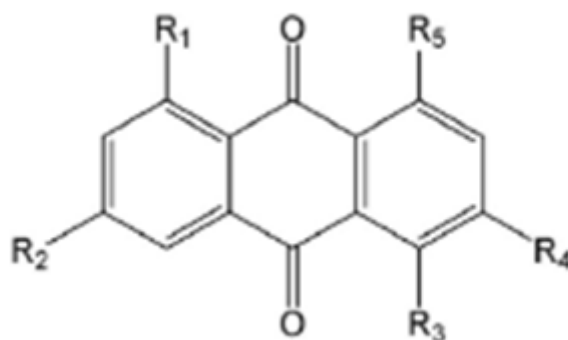
A forma mais adequada de classificação dos corantes é através da sua estrutura química, agrupando-os em categorias que possuem características semelhantes. Dentre essas categorias são encontradas diversas classes de corantes incluindo as antraquinonas.

### 3.2. ANTRAQUINONAS

As antraquinonas são constituintes de uma família de compostos que ocorrem naturalmente em algumas plantas e que possui um largo espectro de aplicações e propriedades bioativas. São descritos mais de 700 corantes naturais onde os mais frequentemente reportados são emodina, parietina, catenarina e reno (Tabela 2), e sendo que 200 destes são provenientes de plantas floridas e os demais de fungos e líquens. Eles podem ser encontrados em todas as partes da planta: raízes, caules, frutos, flores e folhas. A maioria dos compostos é derivada da estrutura básica 9,10-antracenediona, um

composto orgânico aromático tricíclico, como fórmula molecular  $C_{14}H_8O_2$ , conforme demonstrado na Figura 2 (DUVAL et al., 2016).

**Figura 2** - Estrutura química geral das antraquinonas.



**Fonte:** DUVAL et al. (2016)

**Tabela 2** - Substituintes de 5 compostos derivados de antraquinona: antraquinona, emodina, parietina, catenarina e reno.

Compostos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Antraquinona	H	H	H	H	H
Emodina	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>	OH
Parietina	OH	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH
Catenarina	OH	OH	OH	CH <sub>3</sub>	OH
Reno	OH	H	H	COOH	OH

**Fonte:** DUVAL et al. (2016)

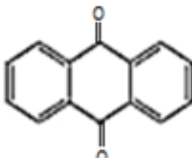
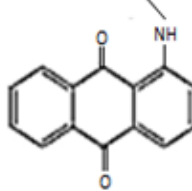
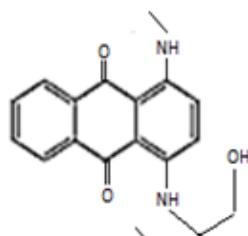
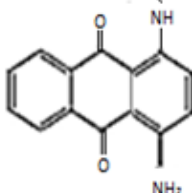
As antraquinonas são o grupo mais numeroso das quinonas naturais. Apresentam-se normalmente como substâncias cristalinas de cor amarela, vermelha ou laranja e estão abundantemente distribuídas no reino vegetal, podendo ser encontradas em plantas superiores até fungos e líquens (SANTOS; SILVA; BRAZ FILHO, 2008).

Uma grande quantidade de produtos naturais tem sido isolada de espécies de plantas e com isso propriedades bioativas consideráveis foram descobertas, tais como fungicidas, inseticidas, reguladores de crescimento e antioxidante. O campo de aplicação destes compostos naturais é bastante amplo, vai desde pesticidas à indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica. Além disso, quando se trata de sustentabilidade, torna-se um

atrativo econômico devido a natureza biodegradável e produção renovável (DUVAL et al., 2016).

O espectro eletromagnético das antraquinonas pode ser modificado através do tipo e número de substituintes, assim como da posição em que ocupam, possibilitando diferentes colorações para estes compostos. Ao introduzir substituintes receptores de elétrons não haverá um efeito significativo no espectro. No entanto com a substituição por um composto doador de elétrons, como por exemplo, grupos amino ou amino substituídos, pode provocar um grande impacto na produção dos corantes variando de uma coloração amarela, passando por azul e vermelha até a coloração verde, como demonstrado na Tabela 3 (DUVAL et al, 2016).

**Tabela 3** - Atribuição de fonte natural e índice de cor de alguns corantes de antraquinona.

Nome	Fórmula	Cor
Antraquinona		Amarelo
1-(metilamino)antraquinona		Vermelho
1-metilamino-4-(hidroxietilamino)antraquinona		Roxo
1-metilamino-4-(amino)antraquinona		Azul

Fonte: DUVAL et al. (2016)

As quinonas e derivados de quinonas são uma importante classe de moléculas com ampla aplicação em áreas como corantes industriais, biologia,

química farmacêutica, entre outras (DAHIYA et al, 2007; DE MACEDO et al., 2016).

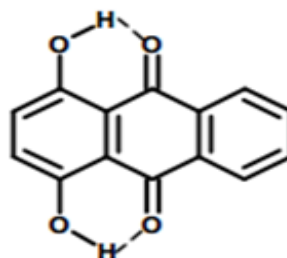
De acordo com a literatura, na área farmacêutica as antraquinonas têm demonstrado propriedades anti-inflamatória, imunossupressora, diurética, laxativa, vasodilatadora, antioxidante, antitumorais, antibacterianas, antibióticas, antifúngicas, (DUVAL et al., 2016; DE MACEDO et al., 2016) e também são amplamente utilizadas no tratamento do câncer (AL-OTAIBI; SPITTLE; EL GOGARY, 2017).

### 3.3. QUINIZARINA

A quinizarina é um corante sintético (1,4-di-hidroxi-9,10-antraquinona) pertencente à classe das antraquinonas. As hidroxiantraquinonas, como a quinizarina, possuem a habilidade de se intercalar entre as moléculas de DNA, além de serem foto-geradoras de espécies oxidativas e possuir propriedades fotossensíveis para a terapia fotodinâmica. Por isso, estes compostos tornaram-se interessantes substratos para marcadores no tratamento do câncer (MACHATOVÁ et al., 2016).

A quinizarina (Figura 3) apresenta emissão de fluorescência por possuir ligações de hidrogênio intramoleculares assistidas por ressonância. Essas ligações estabilizam os orbitais  $\pi$  e colocam a transição  $\pi$ -  $\pi^*$  em mais baixa energia que a  $n$ -  $\pi^*$ ; dessa forma, impede o cruzamento intersistemas  $S_1 \rightarrow T_1$  e desativação da fluorescência. Por consequência, a energia absorvida é perdida pela emissão de radiação (fluorescência) (SABATINI, 2012).

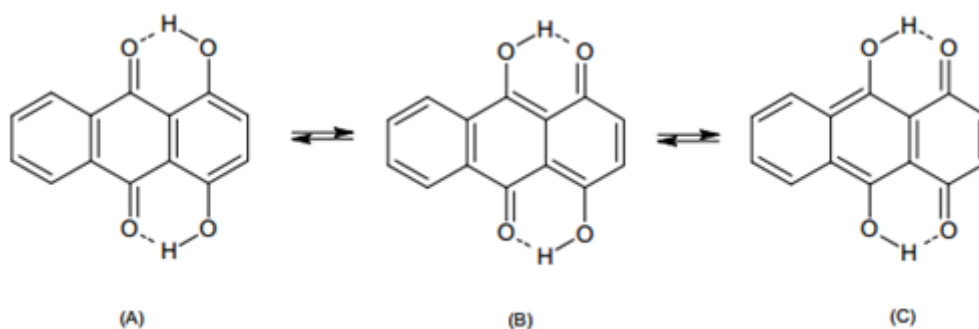
**Figura 3** - Estrutura química da quinizarina (QZN)



**Fonte:** SABATINI (2012).

A quinizarina, quando em solução, é um composto altamente fluorescente e apresenta uma banda estruturada de emissão, devido à formação de estruturas tautoméricas, causada pela transferência interna de um próton (Figura 4). Além disso, a presença de ligações de hidrogênio confere à quinizarina alta intensidade de fluorescência, o que não é facilmente mensurável em seus derivados por ocorrer a quebra destas ligações de hidrogênio (SABATINI, 2012).

**Figura 4** - Estruturas tautoméricas da quinizarina



**Fonte:** SABATINI (2012).

### 3.4. NANOTECNOLOGIA

Em 1959, Richard Feynman discorreu sobre a possibilidade de manipular os materiais em níveis atômicos. Por isso, é considerado o cientista precursor da ciência denominada Nanotecnologia (HULLA; SAHU; HAYES, 2015). Segundo Feynman, as leis que regem a dimensão atômica são fundamentalmente diferentes, por isso permite novas possibilidades de funcionalidade das estruturas (ALENCAR et al., 2017). No entanto, somente 15 anos mais tarde, Norio Taniguchi criou a palavra “nanotecnologia” definindo-a como o conjunto de estudos e aplicações referentes aos objetos e processos na escala de nanômetro (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

A ISO (2003) traz duas definições para nanotecnologia: (i) entendimento e controle da matéria e processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente abaixo de 100 nm em uma ou mais dimensões, em que o aparecimento de fenômenos dependentes de tamanho permite novas aplicações; (ii) utilização das propriedades dos materiais em nanoescala que são diferentes das propriedades dos átomos individuais, moléculas, ou dos

materiais macroscópicos, criando materiais, dispositivos e sistemas melhores que exploram essas novas propriedades.

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar e capaz de solucionar muitos problemas no âmbito industrial e econômico; isso por que estuda as propriedades manifestadas em escala nanométrica, nas quais não seriam possíveis em escalas maiores, proporcionando a criação de novos materiais. Muitas são as aplicações utilizadas atualmente, como chips, sensores, fibras de tecido, produtos esportivos (ALENCAR et al., 2017), assim como diferentes aplicações nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (HULLA; SAHU; HAYES, 2015). Na área da saúde os avanços são ainda mais significativos no diagnóstico de doença e produção de medicamentos mais eficazes e com maior segurança (ALENCAR et al., 2017).

Na área farmacêutica estes materiais são de grande interesse devido a aplicação em sistemas de liberação de fármacos (MARCATO; DURÁN, 2008), pois oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas tradicionais (PRIMO, 2009). Além disso, tem sido possível resgatar moléculas ativas, que foram anteriormente descartadas devido à descoberta de potenciais efeitos colaterais ou baixa biodisponibilidade, através do uso de uma nova formulação utilizando as nanopartículas, tornando essa área ainda mais promissora (ROSSI-BERGMANN, 2008).

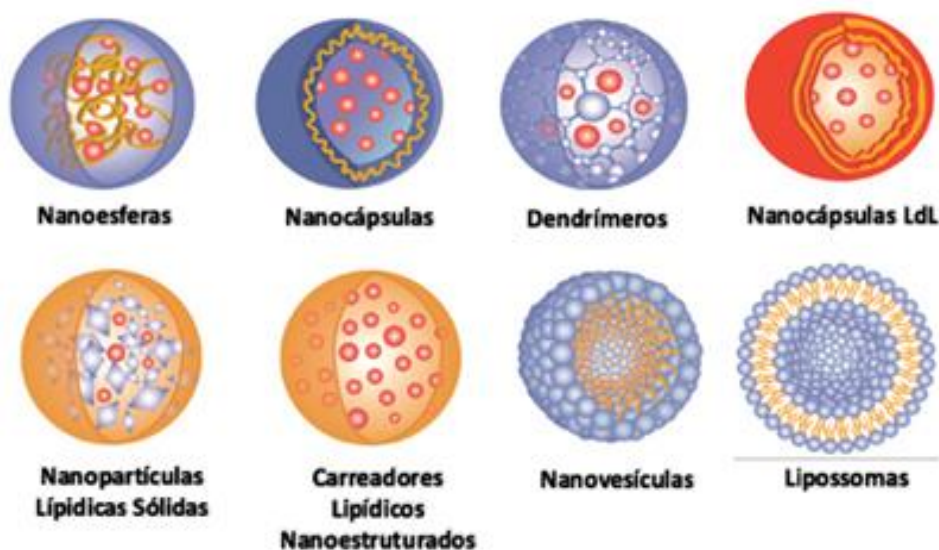
### **3.4.1 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA**

A proposta da nanotecnologia aplicada à área farmacêutica é desenvolver formulações à base de nanocarreadores biocompatíveis e biodegradáveis que têm como principal característica a habilidade em aprimorar a interação e liberação do princípio ativo no seu sítio alvo (célula, órgão ou microrganismo) (SIQUEIRA-MOURA, 2011), promovendo uma maior eficácia terapêutica, além de prolongar o tempo de meia vida do fármaco, retardar sua degradação química ou enzimática, diminuir os efeitos colaterais e aumentar sua biodisponibilidade, além de promover melhor aceitação ao tratamento, pois o medicamento possui menos efeitos colaterais e um maior intervalo de administração (BOULAIZ et al 2011; DE AZEVEDO, 2005;

FIGUEIRAS; COIMBRA; VEIGA, 2014; ROSSI-BERGMANN, 2008; SIQUEIRA-MOURA, 2011).

São utilizados diferentes materiais para obter as formulações nanotecnológicas e estes são escolhidos a partir das suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento. O encapsulamento de fármacos pode ser feito por diferentes mecanismos, como: solubilização ou retenção na nanopartícula, conjugação ou adsorção. As nanopartículas atuam como nanocarreadores, transportando o fármaco para um local específico onde irão exercer sua atividade terapêutica. Entre os nanocarreadores disponíveis, os principais utilizados na terapêutica são os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as micelas e as nanopartículas poliméricas, como apresentado na Figura 5 (DIMER et al., 2013).

**Figura 5** - Esquema ilustrativo com as principais estruturas poliméricas utilizadas como sistemas nanocarreadores de fármacos



**Fonte:** Adaptado de PRIMO, F. L. et al (2009).

Nanocápsulas são definidas como sistemas vesiculares submicrônicos compostos de um núcleo oleoso envolto por uma fina membrana polimérica (FENG; MUMPER, 2013). Algumas das vantagens de utilizar como sistema de liberação de fármacos são a alta eficiência em relação ao encapsulamento de fármacos lipofílicos, a proteção do fármaco contra degradação química, a

redução da irritação tecidual devido à membrana polimérica, baixo teor de polímero quando comparado às nanoesferas e aprisionamento de fármacos em uma região matricial central, podendo evitar o efeito de degradação ou desestruturação da partícula. O fármaco hidrofóbico pode ser aprisionado nesta matriz central oleosa e/ou adsorvido na membrana polimérica de recobrimento das nanocápsulas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013; SOUTO et al, 2011).

As nanoesferas são nanopartículas com diâmetro entre 10 a 200 nm onde a porção hidrofóbica está voltada para a parte interna da estrutura e as cadeias hidrofílicas para a superfície (SQUILLARO et al, 2018). Diferentemente das nanocápsulas, não possuem óleo em sua composição e o fármaco pode estar retido ou adsorvido na matriz polimérica (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003).

Os dendrímeros são estruturas poliméricas nanométricas (2-10 nm de diâmetro) tridimensionais, homogêneas e hiper-ramificadas, contendo múltiplos grupos funcionais em sua superfície, o que os torna extremamente versáteis e biocompatíveis (SHERJE et al, 2018).

A utilização de formulações baseadas em lipídeos tem demonstrado influências positivas na absorção de fármacos, além de possuírem baixa toxicidade. As nanopartículas lipídicas sólidas são nanoesferas compostas por um lipídio sólido com diâmetro médio entre 50 e 1000nm (escala nano-submicron) após o encapsulamento do ativo. São compostos de moléculas lipídicas biodegradáveis e biocompatíveis e não requerem o uso de solventes orgânico em sua formulação. Os carreadores lipídicos nanoestruturados são compostos por uma mistura de lipídios no estado sólido e líquido facilitando a incorporação de mais moléculas de fármaco além de aumentar sua proteção do (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017).

Os lipossomas e as nanovesículas são vesículas fosfolipídicas de tamanho de partícula de 30nm a micrometros e constituídas de uma (nanovesículas) ou mais bicamadas lipídicas (lipossomas) concêntricas que envolvem o meio aquoso. Devido a sua capacidade de encapsular tanto moléculas lipofílicas quanto hidrofílicas podem encapsular uma vasta gama de fármacos (BATISTA et al, 2007).

### 3.5. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Os métodos espectroscópicos são fundamentados pelo produto da interação da matéria e energia eletromagnética. A seletividade e sensibilidade destes métodos são dependentes da concentração da amostra assim como da estrutura química e intensidade ou frequência de energia utilizada (GIL, 2007).

Quando se trata da concentração sempre existe uma relação direta e proporcional. No entanto, é a estrutura molecular da substância analisada que define a frequência de maior absorção e conferem a sensibilidade e seletividade do método (GIL, 2007).

A radiação eletromagnética é uma forma de energia propagada em ondas, e pode ser dividida em regiões de comprimento de onda distinto. Também pode ser considerada como um fluxo de partículas denominadas fótons e cada um destes fótons contém determinada energia cuja magnitude é proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda. O comprimento de onda é, normalmente, especificado em nanômetros, nm ( $10^{-9}$ m) (ANVISA, 2010).

#### 3.5.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS

A espectrofotometria de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível (UV-VIS) e infravermelho, de acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada (Tabela 4). A utilização desta técnica vai desde a identificação até a quantificação de substâncias (ANVISA, 2010).

**Tabela 4** - Faixas de comprimento de onda de interesse para a espectrofotometria.

Região	Faixa de Comprimento de onda
Ultravioleta (UV)	190 – 380 nm
Visível (VIS)	380 – 780 nm
Infravermelho próximo (NIR)	780 – 2500 nm ( $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ )
Infravermelho médio (MIR)	4 – 25 $\mu\text{m}$ ( $2500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ )
Infravermelho distante	25 – 300 $\mu\text{m}$ ( $400 - 33 \text{ cm}^{-1}$ )

Fonte: ANVISA (2010).

Por ser uma técnica robusta, com custo relativamente baixo e com vasta possibilidade de aplicações a espectrofotometria na região UV-VIS tem sido uma das técnicas mais utilizadas (BARBOZA et al., 2010), principalmente na

indústria farmacêutica que preza pela rapidez e confiabilidade dos resultados, além do baixo custo e simplicidade de utilização (ALVES et al., 2010; GALO; COLOMBO, 2009). Por todas as vantagens citadas, vem sendo uma alternativa aos métodos cromatográficos que utilizam maior quantidade de solventes, além de levarem mais tempo no preparo das amostras e possuírem instrumentação mais dispendiosa, eleva o custo final da análise (WEINERT; PEZZA; PEZZA, 2008).

A técnica envolve medidas diretas de espécies que absorvem radiação, assim como medidas após derivação química e também podem ser acoplados a diferentes técnicas ou processos, como cromatografia e eletroforese (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Quando as moléculas absorvem energia ocorre a transição para um estado de maior energia ou excitado, esta passagem não é de natureza contínua, realizando-se, geralmente, em etapas que são chamadas de transições eletrônicas. Na região do ultravioleta e visível ocorrem transições eletrônicas em porções da molécula chamadas de cromóforos. As transições fazem com que os elétrons migrem de orbitais moleculares ocupados para orbitais de energia superiores (ANVISA, 2010).

O cálculo da transmissão (T) é realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Onde,  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente e  $I$  é intensidade da radiação transmitida.

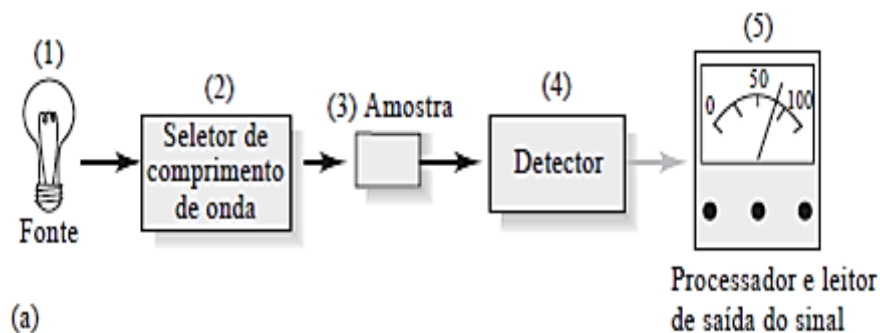
A espectrofotometria é fundamentada na Lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção (A) de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (ROCHA; TEIXEIRA, 2004):

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

A instrumentação utilizada no ultravioleta (UV) e visível (Vis) são os espectrofotômetros, compostos essencialmente, de fonte de radiação; seletor

de comprimento de onda; celas de absorção (cubetas), para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática; detector de radiação e uma unidade de leitura e processamento de sinal, conforme demonstrado na Figura 6 (ANVISA, 2010).

**Figura 6** - Esquema de um espectrofotômetro



**Fonte:** SKOOG et al (2006).

A relação direta entre a concentração da substância e a quantidade de luz absorvida (Lei de Beer), é o princípio fundamental para a análise espectrofotométrica quantitativa.

Equação de Beer:

$$A = \varepsilon b c \quad (3)$$

Onde,  $A$  é a absorvância, logaritmo do inverso da transmitância ( $A = -\log T$ );  $\varepsilon$  a absorvidade molar ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $c$  a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $b$  o caminho óptico (cm) e  $T$  a transmitância.

Sabendo que a transmitância ( $T$ ) é o quociente entre a intensidade da radiação transmitida pela solução ( $I_0$ ) e a intensidade da radiação incidente ( $I$ ), temos:

$$\log_{10} (I_0/I) = A = \varepsilon b c \quad (4)$$

### 3.5.2. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

A luminescência é a emissão de luz de qualquer substância e ocorre a partir de estados eletronicamente excitados. É formalmente dividido em duas

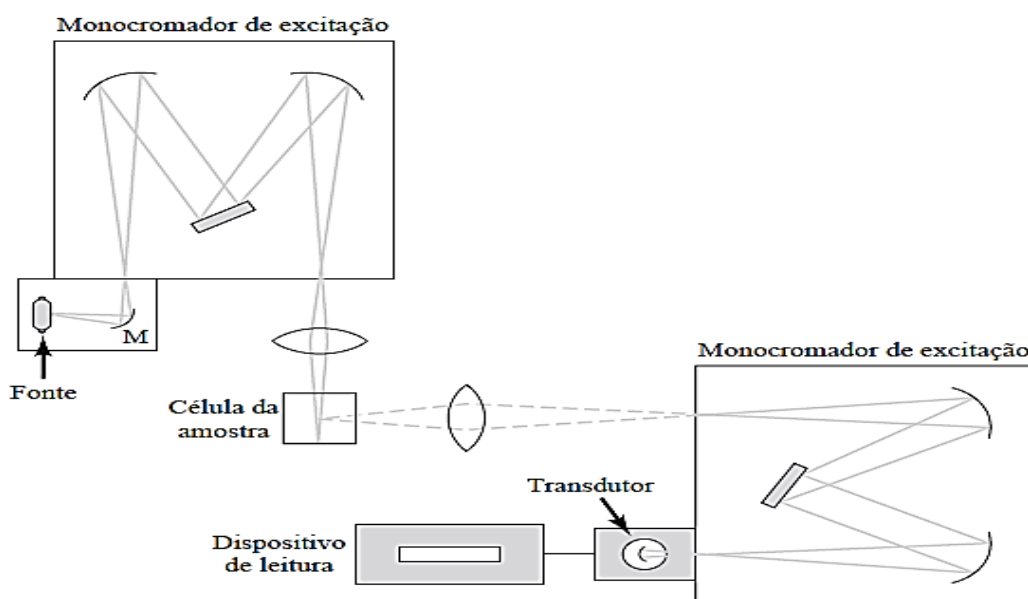
categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado (LACKOWITCZ, 2004 ).

A espectrofluorimetria compreende a medida da fluorescência emitida quando as substâncias ditas fluorescentes são expostas à radiação ultravioleta, visível ou outras também de natureza eletromagnética.

As radiações provocam a excitação dos elétrons da molécula para níveis energéticos mais elevados, por um curto espaço de tempo ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  segundos), e por isso os elétrons retornam ao estado fundamental através de um processo não radioativo, chamado desativação por colisão, juntamente com um processo radioativo chamado luminescência (fluorescência ou fosforescência), ou seja, ao retornarem ao estado menos energético ocorre a emissão de luz (ANVISA, 2010).

Conforme pode ser observado na Figura 7, para medidas de fluorescência são necessários dois seletores de comprimento de onda para selecionar os comprimentos de onda de excitação e emissão. A radiação da fonte é selecionada e incidida na amostra, enquanto a radiação emitida é medida, normalmente em ângulo reto para evitar o espalhamento (SKOOG et al. 2006).

**Figura 7** - Esquema de um espectrofluorímetro



**Fonte:** SKOOG et al. (2006)

A escolha do solvente ideal para utilizar no preparo de soluções fluorescentes exige planejamento, pois as características químicas e o pH são parâmetros que podem influenciar na intensidade e distribuição espectral da fluorescência. A experimentação em diferentes solventes é extremamente importante para determinar a propriedade fluorescente de uma substância, já que muitas substâncias que apresentam fluorescência em solventes orgânicos são praticamente não fluorescentes quando dissolvidas em água devido efeitos de solubilidade e/ou supressão de estados excitados (ANVISA, 2010).

Entre as vantagens da fluorimetria com relação à absorção no UV-VIS, pode-se destacar a sensibilidade (100 vezes maior) e também a seletividade. Como desvantagem existe a limitação de aplicação da técnica já que somente algumas moléculas apresentam fluorescência (ANVISA, 2010).

Técnicas analíticas baseadas na detecção de fluorescência são muito populares devido à alta sensibilidade e seletividade, assim como pelas vantagens do espaço e resolução temporal, e a possibilidade de sensoriamento remoto usando fibras ópticas. Quando um analito é fluorescente, a detecção fluorimétrica direta é possível por meio de um espectrofluorímetro operando em comprimentos de onda de excitação e absorção adequados (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012).

A espectroscopia de luminescência é uma ferramenta analítica bastante sensível e com ampla aplicação quando se trata da necessidade de baixos limites de detecção. Por isso são facilmente encontrados na literatura trabalhos mostrando análises ao nível de traços, devido à alta sensibilidade quando comparada a outras metodologias, tais como a espectrofotometria UV-VIS. Isso ocorre por que nas medidas de absorbância o sinal está associado à atenuação da intensidade de um feixe de radiação por uma espécie absorvente, tornando difícil a detecção quando a quantidade de espécie na amostra é pequena, e isto não acontece na luminescência (SOTOMAYOR et al., 2008).

Outro aspecto importante da luminescência se trata da seletividade, pois espécies com rendimentos quânticos de fluorescência altos ( $\Phi_f > 0.7$ ) são bem

menos comuns. Moléculas fluorescentes possuem comprimento de onda de excitação e/ou emissão característicos (SOTOMAYOR et al., 2008).

Aliado a todas essas vantagens, a técnica também possui instrumental simples e com baixo custo de manutenção e análise, quando comparado a outros métodos analíticos. Por isso, têm sido amplamente utilizada na análise de muitos compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial (SOTOMAYOR et al., 2008).

### **3.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

O termo oficial validação foi registrado pela primeira vez na *Good Manufacturing Practices – GMP’S* publicadas pelo *FDA (Food and Drug Administration)* em 1978, porém apenas em 1980 foi definida como: “o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado”.

Após isso, em 1992 a OMS (Organização Mundial da Saúde) adotou a Validação de métodos analíticos e processos em suas BPF’s (Boas Práticas de Fabricação). No Brasil, a validação de métodos analíticos apareceu pela primeira vez com a publicação da Resolução RE nº475/2002 que foi revogada no ano seguinte pela RE nº899/2003, e então tornou-se exigida nas resoluções RDC nº17/2010 e RDC nº31/2010. Em 2017, a RE nº899/2003 foi substituída pela RDC 166/2017 que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos.

O termo validação vem sendo constantemente discutido e expandido, por ser um requisito fundamental para a indústria farmacêutica, para comprovar um altíssimo padrão de qualidade, devido ao impacto que os produtos farmacêuticos podem ter na vida dos consumidores. Algumas das definições de guias e normas referentes ao processo estão transcritas a seguir.

Segundo a RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017). “A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.”

A Norma nº 17025 (INMETRO, 2003), estabelece que “a validação é definida como confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional”.

De acordo com a Farmacopeia Americana (USP), “a validação de métodos assegura a credibilidade desses durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionados como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer”.

Por fim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define a validação como “avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob condições nas quais deve ser aplicado”.

De um modo geral, a validação busca comprovar que os resultados analíticos para uma determinada amostra expressem qualidade, confiabilidade, rastreabilidade e comparabilidade.

Os parâmetros preconizados para a realização de um estudo de validação de métodos são especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez. A definição para cada um deles, segundo o ICH (2005), está descrita a seguir.

a. Especificidade/Seletividade:

A seletividade é definida como a capacidade de avaliar inequivocamente o analito na presença de componentes que podem estar presentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (USP, 2018).

Para métodos de identificação, a seletividade é utilizada para assegurar a identidade do analito, devendo obter resultado positivo para a amostra contendo o analito e resultado negativo para outras substâncias presentes na amostra. Para métodos quantitativos e ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada por meio de comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito e garantir que todos os procedimentos analíticos realizados permitam uma declaração precisa do conteúdo de impurezas ou potência exata de um analito na amostra (ANVISA, 2017).

De acordo com o ICH (*International Conference on Harmonisation*), a escolha de tais materiais potencialmente interferentes deve ser baseada em um julgamento científico sólido, com a consideração das interferências que podem ocorrer (ICH, 2005).

b. Linearidade:

A linearidade deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser estabelecida para toda a faixa estabelecida para o método.

Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata.

Para a avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados (ANVISA, 2017):

- I. Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;
- II. Gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística (nível de significância de 5%);
- III. Equação da reta de regressão de  $y$  em  $x$ , estimada pelo método dos mínimos quadrados. A homocedasticidade dos dados deve ser avaliada para utilização do modelo adequado;
- IV. Avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação ( $r$ ) e determinação ( $r^2$ ). O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990;
- V. Avaliação da significância do coeficiente angular que deve ser significativamente diferente de zero.

c. Limite de Detecção:

O limite de detecção é a menor concentração de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada.

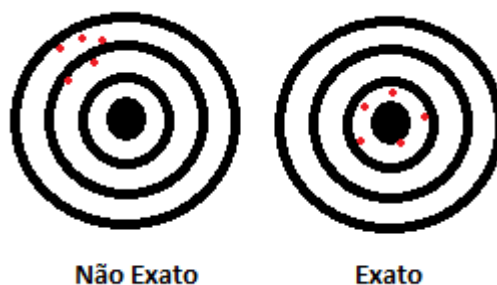
d. Limite de Quantificação:

O limite de quantificação é a menor concentração de analito que pode ser quantificada apresentando precisão e exatidão.

e. Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro, conforme exemplo demonstrado na Figura 8 (ANVISA, 2017).

Figura 8 - Esquema do conceito de exatidão.



A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (ANVISA, 2017).

A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra e a concentração teórica correspondente, como demonstrado na Equação 4. O desvio padrão relativo (DPR) também deve ser calculado para cada concentração (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

f. Precisão:

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão deve ser determinada em três níveis:

- Repetibilidade: concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo analista utilizando a mesma instrumentação dentro de um curto espaço de tempo, ou seja, dentro das mesmas condições de operação.  
O ensaio deve ser realizado com, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% da concentração do teste individualmente preparadas.
- Precisão intermediária: concordância entre os resultados intralaboratoriais obtidos em diferentes dias e realizados por analistas diferentes. O ensaio deve contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.
- Reprodutibilidade: concordância entre resultados obtidos em laboratórios diferentes através de um estudo colaborativo. Ao realizar um estudo de reprodutibilidade não é necessário realizar a avaliação da precisão intermediária.

A precisão deve ser demonstrada através da dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições, conforme a Equação 6.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (6)$$

Em que: DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

A Figura 9 faz um comparativo entre os conceitos de precisão e exatidão.

**Figura 9** – Esquema comparativo entre os conceitos de precisão e exatidão.



g. Robustez

É a capacidade do método em permanecer inalterado na presença de variações pequenas, mas propositalis – nos parâmetros descritos dos métodos analíticos. Este estudo fornece evidências de confiabilidade no desempenho do método, por isso é recomendado que seja determinada durante o desenvolvimento. Caso haja susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, essas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no método.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

Os reagentes químicos descritos a seguir foram empregados sem nenhum tipo de tratamento prévio ou modificação química. Todos os solventes utilizados foram de alta pureza com grau analítico.

Dimetil-sulfóxido (LS Chemicals); acetonitrila grau analítico (JT Baker), acetona (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e quinizarina 96% (Sigma Aldrich).

O corante vermelho derivado de antraquinona foi fornecido após a produção por processo fermentativo submerso e purificado pelo grupo de pesquisa do Prof. Alberto Colli Badino Junior, do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, *campus* de São Carlos/SP, em colaboração com o Prof. Álvaro de Baptista Neto, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

Para preparo de todas as soluções e formulações foi utilizada água ultrapura obtida do sistema E-Pure Barnstead (Millipore, Cotia, São Paulo).

Para preparo das nanocápsulas foram utilizados os seguintes reagentes químicos: Kolliphor P188, Pluronic F-68, óleo de soja (Sigma-Aldrich co. St. Louis, MO, EUA), fosfatidilcolina de soja - Lipoid S 100® (Ludwigshafen, Alemanha), e poli (ácido láctico- co-glicólico (PLGA)(Sigma-Aldrich). Como princípio ativo foi empregado o corante sintético quinizarina 96% (Sigma Aldrich).

## **4.2. EQUIPAMENTOS**

Na obtenção dos espectros de absorção e emissão de fluorescência no estado estacionário utilizou-se o espectrofotômetro UV/Vis de feixe duplo Genesys 10s (*Thermo Scientific, EUA*) e um espectrofluorímetro modelo RF 6000 (*Shimadzu, Alemanha*) ambos alocados no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

## **4.3. MÉTODOS**

### **4.3.1. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO**

Os espectros de absorção e de emissão de fluorescência da quinizarina (QZN) e do corante vermelho (CV) livres foram obtidos no estado estacionário como parte da caracterização espectroscópica. Os espectros foram adquiridos utilizando-se de cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. Para as medidas de fluorescência estabeleceu-se um protocolo com excitação fixa em 480 nm, fendas de excitação e emissão de 10/10 nm respectivamente e faixas de aquisição de 520 a 680 nm.

### **4.3.2. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOCAPSAULA DE QUINIZARINA**

#### **4.3.2.1. PROTOCOLO DE PREPARO DA NANOCÁPSULA POLIMÉRICA CONTENDO QUINIZARINA**

As nanocápsulas poliméricas foram preparadas usando o método de nanoprecipitação ou deposição interfacial do polímero pré-formado conforme descrito por Fessi em 1989, com algumas modificações. Este método permite a formação espontânea de gotículas nanométricas oleosas rodeadas por uma membrana polimérica. Foram preparadas nanocápsulas somente com QZN

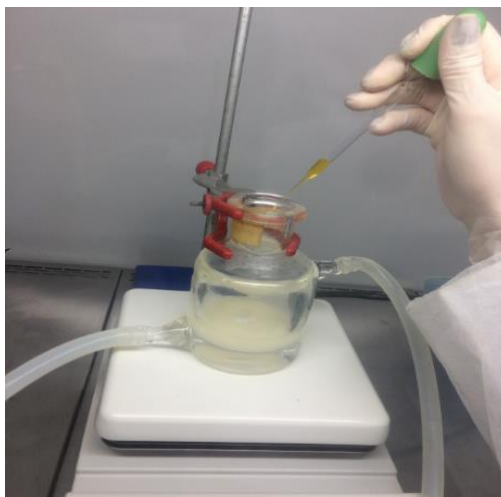
(QZN/NC) na concentração de 0,1mg/mL de corante quinizarina. Uma quantidade exata de polímero PLGA 50:50 (0,75% m/v) e lecitina de soja (fosfatidilcolina de soja) a 1,75% m/v, foram pesados e dissolvidos em 15 mL de acetona a 40 °C denominado fase orgânica. O corante QZN foi dissolvido separadamente em acetona com ajuda de banho ultrassônico e adicionado a fase orgânica, posteriormente a adição do óleo de soja na fase orgânica.

A fase orgânica foi gotejada sob a solução aquosa contendo Pluronic F-68 (1,25% m/v) em 30 mL de água sob agitação moderada e constante (250 rpm) a 40 °C. Após um intervalo de tempo determinado houve a remoção do solvente orgânico do meio por evaporação sob pressão reduzida a 40 °C e rotação de 125 rpm e da amostra à um volume final de 10 mL.

**Figura 10** – Imagem do esquema com reatores camisas utilizados no preparo das formulações.



**Figura 11** – Imagem do preparo da nanocápsulas contendo o corante sintético quinizarina.



#### **4.3.2.2. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA**

Para caracterização físico-química, foi utilizado a medida de tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico) e o potencial zeta ( $\xi$ ) das nanocápsulas, na presença do princípio ativo. As análises foram realizadas seguindo-se os procedimentos operacionais padrões do equipamento Zetasizer®, da Malvern Instruments cedido pelo Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara - UNESP. As amostras para análise foram preparadas diluindo-se 20  $\mu$ L de formulação em 2 mL de água ultrapura contida em uma cubeta de poliestireno com caminho ótico de 1 cm.

#### **4.3.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

##### **4.3.3.1. LINEARIDADE DO CORANTE QUINIZARINA**

A linearidade é a capacidade do método de apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra. Dessa forma, as análises de regressão linear foram realizadas construindo um gráfico densidade óptica *versus* concentração da quinizarina em  $\mu$ g/mL para a curva por espectroscopia de absorção e intensidade de fluorescência *versus* concentração da quinizarina em  $\mu$ g/mL.

Para construção da curva, foi preparada inicialmente uma solução estoque de 1,0mg/mL da quinizarina em dimetil-sulfóxido (DMSO) devido à sua capacidade de solubilizar o corante. Para o preparo das soluções de diferentes concentrações foi utilizado o método de diluições sucessivas, utilizando-se de cubeta de quartzo com 1 cm caminho ótico, contendo 2 mL de acetonitrila (ACN) e adicionando frações da solução estoque empregando-se micropipeta (*Eppendorf*) de 10 $\mu$ L para obter as concentrações desejadas. A acetonitrila foi utilizada para as diluições, por ser um solvente polar capaz de dissolver o polímero presente na nanocápsula (SOUTO et al, 2012).

Para estabelecer as linearidades dos métodos propostos foram construídas três curvas de calibração em seis níveis diferentes de concentrações, variando de 1 a 12  $\mu$ g/mL (n=18) para espectrofotometria e 5 a 12  $\mu$ g/mL (n=18) para espectrofluorimetria. Nas análises espectrofotométricas foi obedecida a Lei de Lambert-Beer. A análise estatística para avaliação do

ajuste do modelo linear foi realizada através dos seguintes testes ao nível de significância de 5%:

- Determinação do Coeficiente de Correlação;
- Análise de Variância (ANOVA);
- Teste de Falta de Ajuste (*Lack of fit*);
- Avaliação da normalidade dos resíduos (Teste Breusch-Pagan);
- Avaliação de valores extremos na resposta (Análise Gráfica);
- Avaliação da homocedasticidade (Teste Shapiro-Wilk);
- Avaliação de Pontos Influentes (DCOOK, DFFITS, DBETA);
- Avaliação de Independência (Teste Durbin-Watson).

#### 4.3.3.2. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da quinizarina para os métodos desenvolvidos foram estimados a partir da curva de calibração resultante do parâmetro Linearidade. Os LD e LQ foram calculados de acordo com as Equações 7 e 8, respectivamente (ANVISA, 2017):

$$LD = (DP/b) \times 3,3 \quad (7)$$

$$LQ = (DP/b) \times 10,0 \quad (8)$$

Onde, DP é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo das ordenadas e b o valor da inclinação da curva analítica.

#### 4.3.3.3. SELETIVIDADE

Para avaliar a possível interferência dos excipientes utilizados na formulação de NC foram preparadas soluções padrão de QZN adicionadas com NC vazias (120 µL). As soluções padrão contendo 7,00; 10,00 e 12,00 µg/mL (n = 9) e 9,00; 10,00 e 11,00 µg/mL (n = 9) de QZN foram preparadas para os métodos espectrofotométrico e espectrofluorimétrico, respectivamente. Em seguida foram realizadas comparações entre os resultados obtidos das soluções padrão contaminadas com NC vazias e as soluções padrão de quinizarina “sem contaminação”. A análise dos dados foi realizada utilizando o Teste t de Student (teste bilateral, p = 0,05).

#### 4.3.3.4. EXATIDÃO

A exatidão dos métodos analíticos foi avaliada pelo método de recuperação do analito (QZN). Neste estudo, foram adicionadas alíquotas de NC vazia em soluções de diferentes concentrações de QZN ( $n = 9$ ) e previamente analisada, sendo a concentração total do analito determinada usando os métodos propostos. A porcentagem de QZN recuperada foi calculada de acordo com a Equação 9:

$$\text{Recuperação (\%)} = (Co/Ct) \times 100 \quad (9)$$

Onde,  $Co$  é a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtida de QZN após a adição de placebo e  $Ct$ , concentração teórica de QZN na solução padrão previamente analisada.

#### 4.3.3.5. PRECISÃO

A precisão foi avaliada pela repetibilidade (precisão intradia) e pela precisão intermediária. A repetibilidade foi estudada usando três níveis de concentrações diferentes de QZN: baixa, média e alta, correspondendo a 9,00; 10,00 e 11,00  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 9$ ). Os valores da precisão intradia foram obtidos através da análise de soluções da NC contendo QZN preparadas a partir da solução estoque de NC, analisada no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. Já a precisão intermediária foi determinada em dois diferentes dias e com dois diferentes analistas levando em consideração as mesmas concentrações utilizadas na repetibilidade.

Durante estes dois dias, a precisão intermediária foi avaliada pelas análises de soluções do analito preparadas a cada dia ( $n = 18$ ). Ambas repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas pela porcentagem do desvio padrão relativo (DPR%).

#### 4.3.4. RENDIMENTO EXPERIMENTAL DA ASSOCIAÇÃO DO CORANTE QUINIZARINA

A determinação do conteúdo de QZN incorporado ao sistema nanoestruturado foi realizada utilizando os métodos propostos. Este parâmetro demonstra a quantidade real do corante associado à NC, levando em consideração as perdas durante o processo experimental de preparo.

Inicialmente adicionou-se uma alíquota de 500  $\mu$ L da formulação QZN/NC em um balão volumétrico de 5 mL com acetonitrila de grau analítico e ultrassonicada até total homogeneização para garantir total liberação do analito da formulação.

A quantidade de QZN encapsulada foi estimada através da equação da reta analítica. As soluções amostras foram analisadas pela medida de absorbância em 477 nm, o qual corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção da QZN, enquanto a intensidade de fluorescência relativa foi medida espectrofluorimetricamente com excitação fixa em 480 nm e emissão na faixa de 520 a 680 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as médias dos resultados  $\pm$  erro padrão médio (EPM) foram apresentadas.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

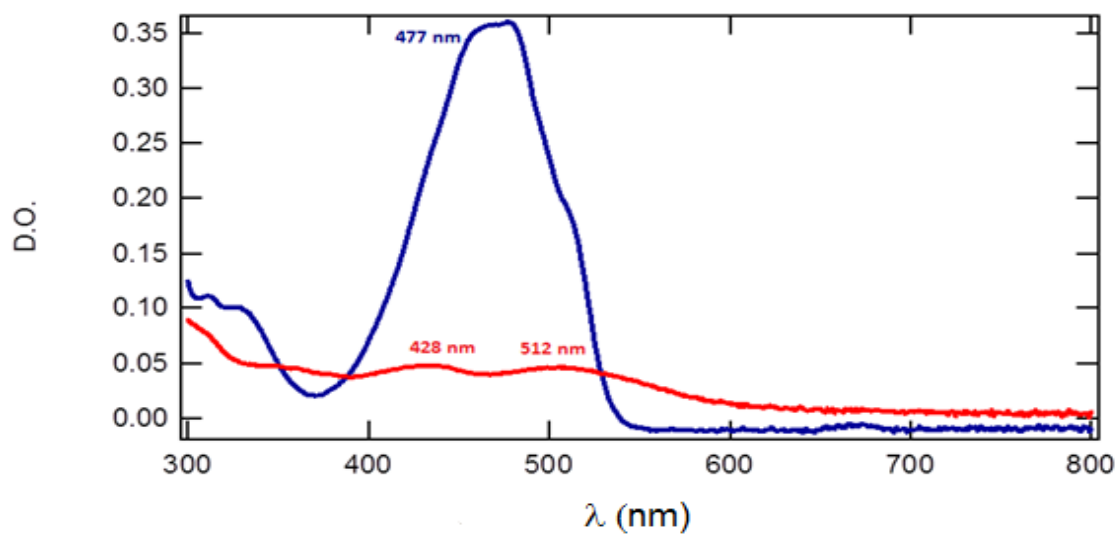
### **5.1. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO**

Foram realizados os estudos de espectroscopia no estado estacionário, para que fosse determinado o perfil do espectro de absorção e emissão da QZN e do CV livres. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-visível, conforme apresentado nas Figuras 12, 13, 14 e 15, respectivamente.

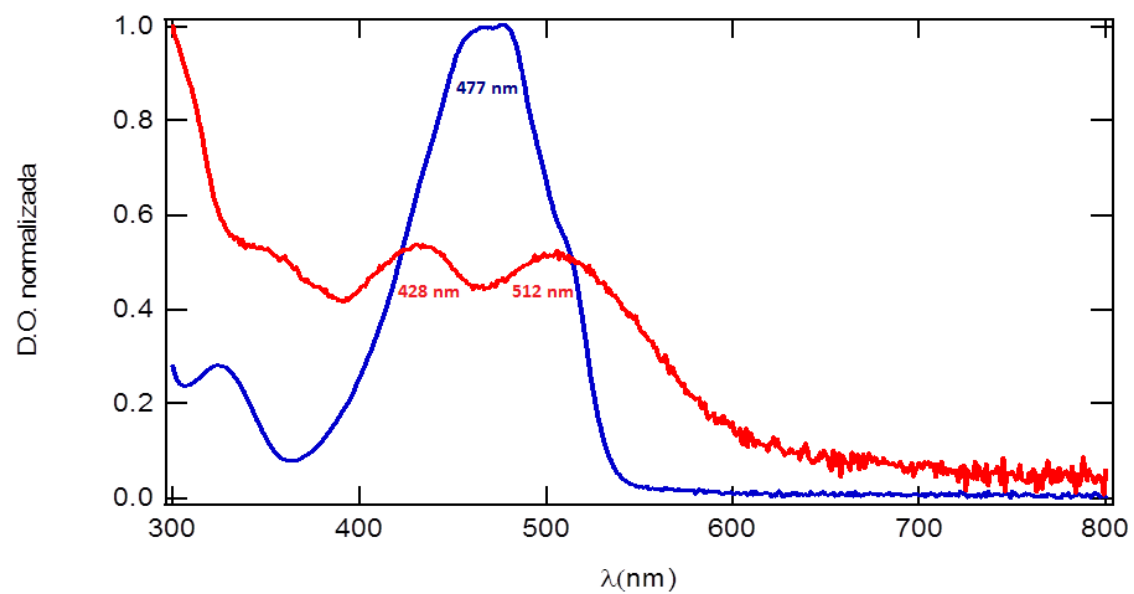
Durante o desenvolvimento dos métodos foi considerado o tipo de solvente orgânico utilizado para as análises. O dimetilsulfóxido (DMSO) e acetonitrila (ACN) demonstraram as melhores características para ambos os métodos analíticos utilizados, uma vez que o DMSO foi capaz de solubilizar o corante e a ACN não apresentou qualquer influência sobre o máximo de absorção ou intensidade de emissão de fluorescência da QZN.

O espectro de absorção da quinizarina apresenta duas bandas principais posicionadas na região do ultravioleta do espectro (300 a 350nm) e na região da luz visível (400 a 550 nm).

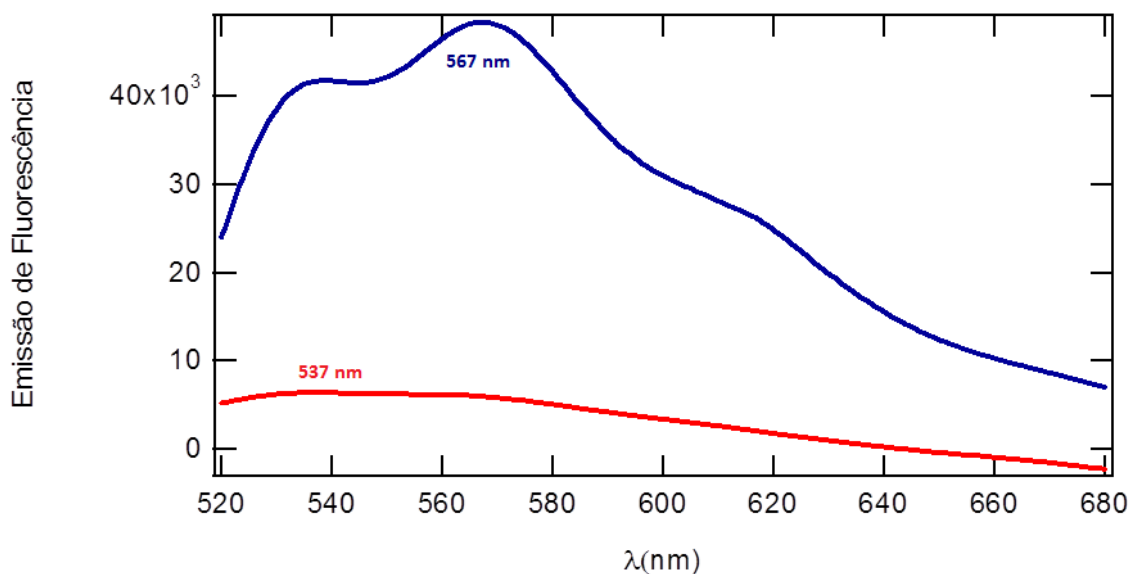
**Figura 12** - Espectro de absorção no UV/VIS da QZN/Acetonitrila (---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10 $\mu$ g/mL.



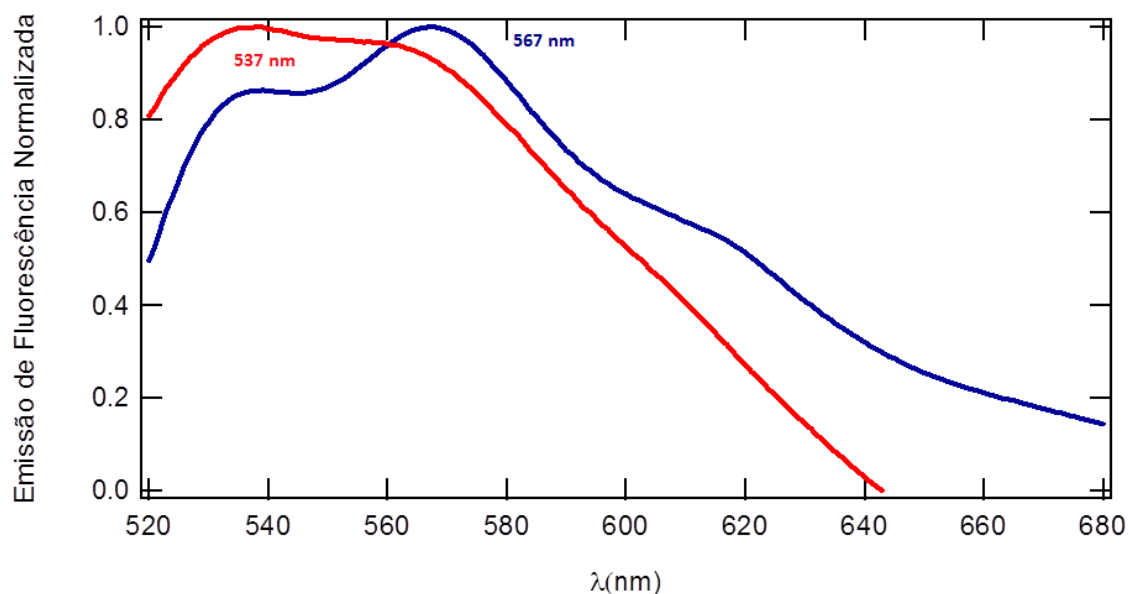
**Figura 13** - Espectro de absorção normalizada UV/VIS da QZN/Acetonitrila (---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10 $\mu$ g/mL.



**Figura 14** - Espectro de emissão de fluorescência UV/VIS da QZN/Acetonitrila (---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10 $\mu$ g/mL, com comprimento de excitação de 480 nm para ambos e fendas de 10,0/10,0 nm para excitação e emissão, respectivamente.



**Figura 15** - Espectro de emissão de fluorescência normalizada UV/VIS da QZN/Acetonitrila(---) e CV/Acetonitrila (---) na concentração de 10 $\mu$ g/mL, com comprimento de excitação de 480 nm para ambos e fendas de 10,0/10,0 nm para excitação e emissão, respectivamente.



Nas Figuras 12 e 13, estão apresentados os espectros de absorção e de absorção normalizado (divisão de todos os valores pelo máximo de absorção para efeito comparativo e verificação de possíveis descolamentos de banda), respectivamente, para os compostos QZN e CV em meio orgânico homogêneo, empregando-se o solvente acetonitrila grau analítico espectroscópico. Utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção no UV-visível foi possível

determinar os máximos de absorção para ambos compostos. A QZN em acetonitrila apresenta sua banda de absorção característica com máximo centrado em 477 nm, na região do azul do espectro-eletromagnético, conforme descrito por HTUN (2009). A varredura para o corante vermelho, analisado no mesmo ambiente químico, demonstra um conjunto de bandas de transição eletrônica do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  com máximos em 428 nm e 512 nm. Estas bandas são características de compostos orgânicos derivados de antraquinonas, conforme descrito por AHN et al (2009). A Figura 13 normalizada demonstra claramente a sobreposição das bandas de absorção referente aos conjuntos espectrais dos compostos QZN e CV, na região de 400 e 550 nm do espectroeletrromagnético visível.

Nas Figuras 14 e 15 estão apresentados os espectros de emissão e emissão normalizado, respectivamente, para os compostos QZN e CV, também em acetonitrila grau analítico espectroscópico. Nas determinações das emissões de ambos compostos foi fixado o comprimento de onda de excitação em 480 nm, tanto para o composto de origem sintética, como para o corante de origem biotecnológica. Como fendas de resolução espectral, foram utilizadas aberturas de 10 nm/10 nm para excitação e emissão, respectivamente. Na Figura 15, está apresentado o estudo comparativo de emissão de fluorescência para ambas moléculas, confrontando os máximos centrados em 567 nm para a QZN e 537 nm para o CV. Neste estudo fotofísico foi possível observar um leve deslocamento de 30 nm, característico do efeito hipsocrômico. Entretanto, observa-se a manutenção da identidade espectral de ambos compostos, com emissão na região de 520 a 650 nm. O potencial fluorescente destes compostos foi comprovante para o meio em estudo, demonstrando que tanto a QZN quanto a CV possuem alta taxa de emissão de fótons, característica de compostos com alto rendimento quântico de fluorescência, ou seja, com grupamentos fluoróforos condizentes com a performance de marcadores fotobiológicos, conforme descrito por GHOLIVAND et al (2012).

## **5.2. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOCÁPSULA DE QZN**

### **5.2.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA.**

Inicialmente caracterizou-se a formulação desenvolvida para determinar o tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico) e potencial Zeta por espalhamento de luz, na ausência e presença do corante QZN.

Estes parâmetros foram determinados conforme descrito na seção experimental (3.3.2.2), sendo necessários para verificar a eficiência do protocolo do preparo das formulações.

As medidas de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas são parâmetros que indicam estabilidade das nanocápsulas.

Nestas análises físico-químicas compararam-se os resultados obtidos na presença e na ausência do corante, demonstrando de forma direta a influência do mesmo no tamanho e carga superficial do sistema nanoestruturado, conforme demonstrado na Tabela 5.

Geralmente, nanopartículas preparadas por diferentes métodos apresentam tamanho de partícula entre 100 e 300 nm, porém vários fatores podem aumentar ou diminuir o diâmetro das partículas. Utilizando-se o método da precipitação de polímeros pré-formados, a presença do fármaco na fase orgânica, antes da precipitação do polímero em meio aquoso, pode ou não influenciar no diâmetro médio das partículas (SCHAFFAZICK, 2003). A Tabela 5 apresenta o diâmetro médio de partícula na ausência (356,0 nm) e presença do corante (244,4 nm).

Índice de polidispersão mede a variação no tamanho das partículas e valores elevados caracterizam um sistema com heterogeneidade. Conforme apresentado na Tabela 5 a presença do corante proporcionou uma redução significativa no índice de polidispersão, conferindo um sistema mais homogêneo e com maior estabilidade (RIGON et al, 2017).

A medida do potencial zeta reflete a carga de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em

razão da associação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. De acordo com a Tabela 5 o corante quando associado ao nanocarreador aumentou o potencial zeta conferindo maior estabilidade física ao sistema, (SCHAFFAZICK, 2003).

**Tabela 5** – Tamanho de partícula e potencial Zeta para as nanocápsulas na presença e ausência do corante quinizarina (QZN)

	NC	QZN/NC
Tamanho de partículas (nm)	356,0	244,4
Polidispersividade (PDI)	0,55	0,38
Potencial Zeta (mV)	-1,5	-15,6

### 5.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

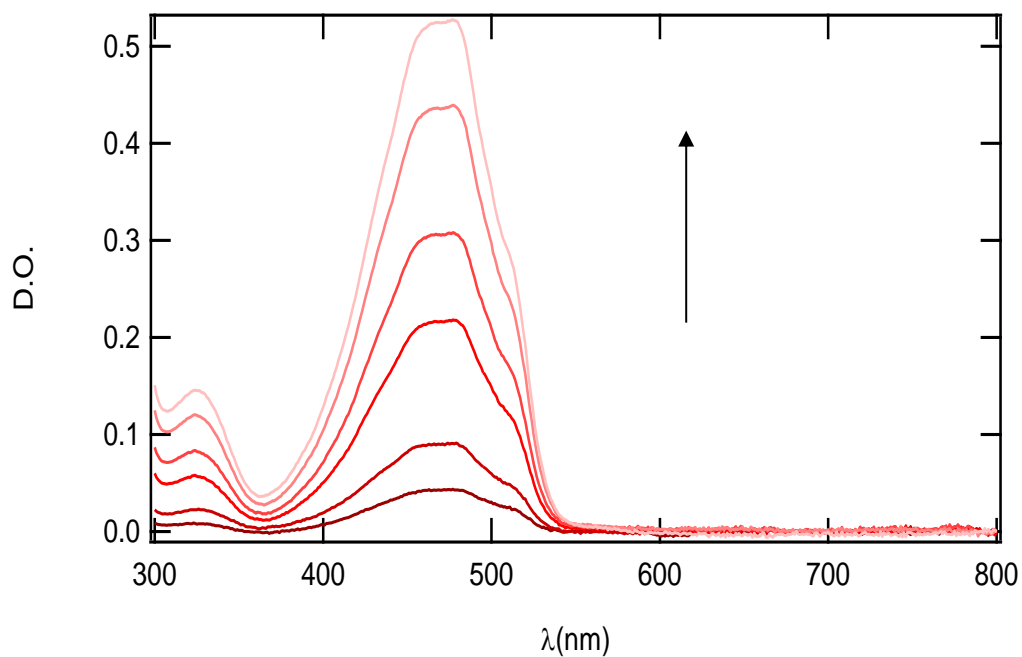
#### 5.3.1. LINEARIDADE

As análises de regressão linear foram realizadas plotando absorbância ou intensidade relativa de fluorescência versus concentração de QZN em  $\mu\text{g/mL}$ , conforme demonstrado nas Figuras 17 e 19, respectivamente. Linearidade satisfatória foi detectada para os métodos espectrofotométrico na faixa de  $1,0 \mu\text{g/mL}$  –  $12 \mu\text{g/mL}$  e espectrofluorimétrico na faixa de  $5,0 \mu\text{g/mL}$  –  $12 \mu\text{g/mL}$ . Os conjuntos de espectros de absorção e emissão de fluorescência no UV-VIS do corante quinizarina estão apresentados nas Figuras 16 e 18, respectivamente. O ajuste por mínimos quadrados para o método espectrofotométrico revelou um excelente coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9999 e a relação linear conforme Equação 10, enquanto que para espectrofluorimetria o coeficiente de determinação foi de 0,9964 e a equação de regressão conforme Equação 11. Contudo, um valor de coeficiente de correlação muito próximo da unidade (por exemplo,  $r > 0,99$ ) não é necessariamente o resultado de uma relação linear e, conseqüentemente, um Teste de Falta de Ajuste deve ser empregado (AMC, 1994; GONZÁLEZ, 2006).

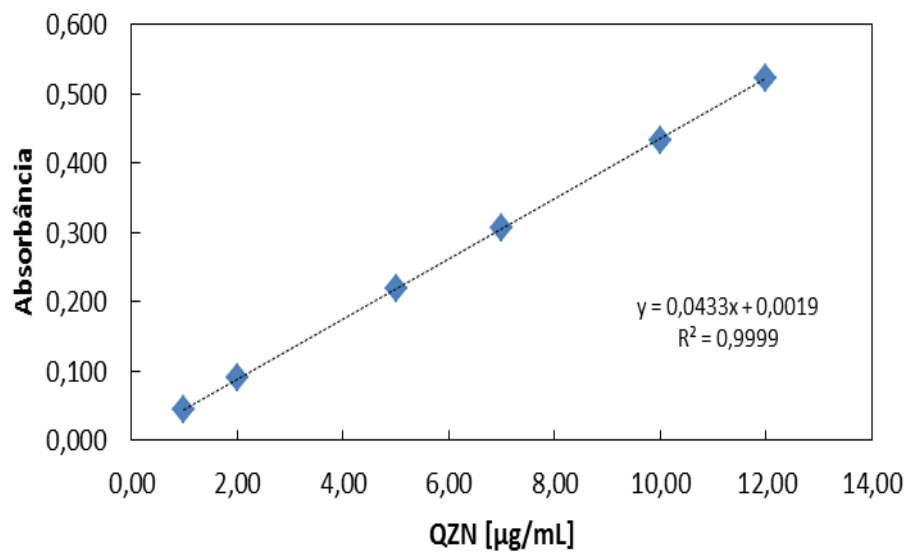
$$\text{absorbância} = 0,0382 \times [\text{QZN}] - 0,0006 \quad (10)$$

$$\text{fluorescência} = 30197 \times [\text{QZN}] + 31436 \quad (11)$$

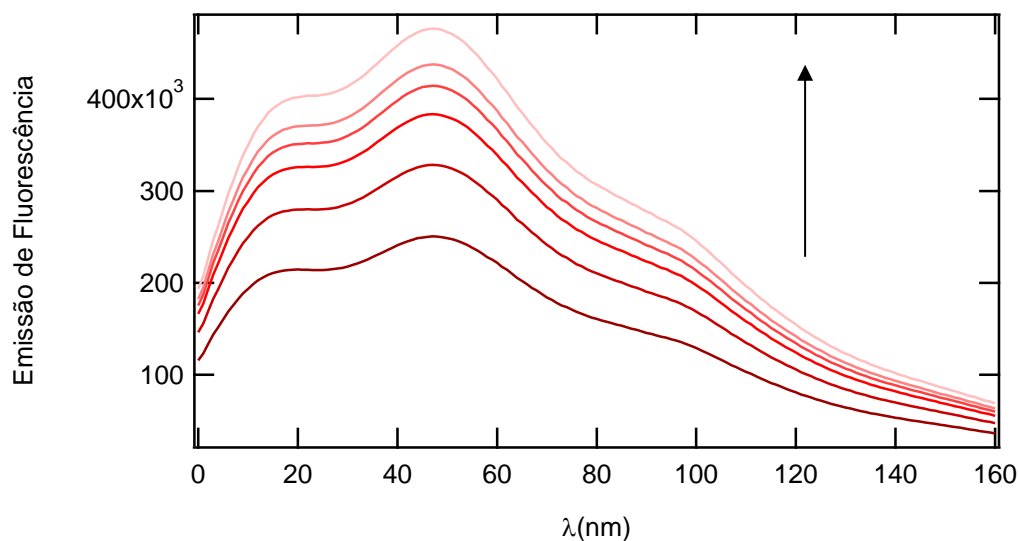
**Figura 16** - Conjunto de espectros de absorção no UV-VIS do corante QZN em solução de acetonitrila em diferentes concentrações (1,0 µg/mL – 12 µg/mL).



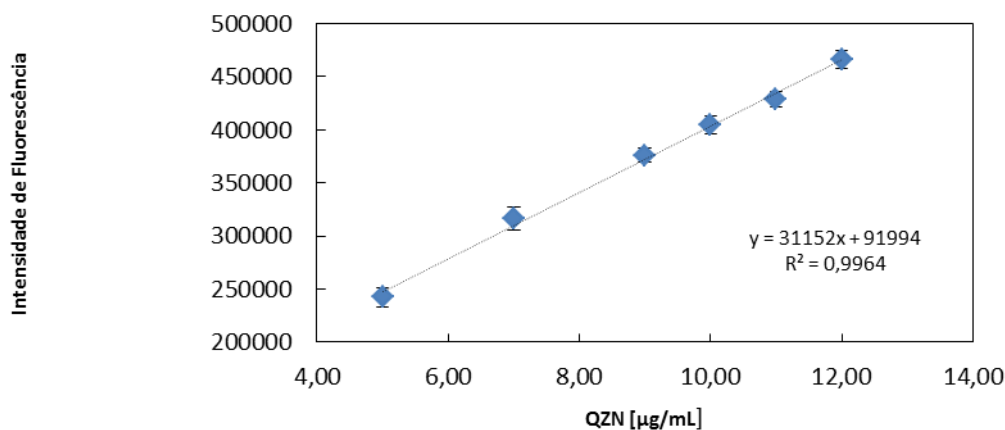
**Figura 17** - Curva de correlação entre absorção máxima em função da concentração de quinizarina na faixa de 1,0 µg/mL a 12 µg/mL (n=3).



**Figura 18** - Conjunto de espectros de emissão de fluorescência no UV-VIS do corante QZN em solução de acetonitrila em diferentes concentrações (5,0 µg/mL – 12 µg/mL).



**Figura 19** - Curva de correlação entre intensidade de fluorescência em função da concentração de quinizarina na faixa de 5,0 µg/mL a 12 µg/mL (n=3).



### 5.3.2. AJUSTE DO MODELO LINEAR

Para confirmar a significância do modelo linear os dados foram tratados com o auxílio do software Stat Camp do Portal Action, seguindo como diretriz o Guia para Tratamentos Estatísticos da ANVISA.

#### 5.3.2.1. ANOVA

A comprovação da significância do coeficiente angular é fundamental para que seja demonstrada a linearidade do método. Essa avaliação é realizada por meio do teste F da análise de variância (ANOVA) que permite

avaliar se uma determinada reta de regressão estimada explica satisfatoriamente a relação existente entre a concentração e a resposta, e também, apresenta fatores diferentes para o cálculo, dependendo do método utilizado (método dos mínimos quadrados ordinários – MMQO ou método dos mínimos quadrados ponderados – MMQP).

A avaliação do ANOVA envolve todas as variáveis possíveis do sistema:

- Regressão: variação das respostas analíticas em relação ao centroide (amplitude do modelo);
- Resíduos: variação das respostas analíticas reais em relação ao modelo (erros);
- Total: soma das variações da regressão e dos resíduos.

Para comprovar que o y (eixo das ordenadas) realmente varia em função de x (eixo das abcissas), ou seja, a comprovação fundamental para a linearidade, é necessário demonstrar que a variação devida à regressão (modelo) é consideravelmente maior que a devida ao erro (resíduos).

Dessa forma, as avaliações da significação dos modelos obtidos para os métodos espectrofotométrico e espectrofluorimétrico, foi realizada através do teste F da ANOVA, testando as seguintes hipóteses:

H0: coeficiente angular igual à zero;

H1: coeficiente angular diferente de zero.

As Tabelas 6 e 7 apresentam a ANOVA para o modelo linear dos métodos validados:

**Tabela 6** – Tabela ANOVA para o método espectrofotométrico.

	gl <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	MQ <sup>c</sup>	Fcal	Ftab	p-valor
Regressão	1	0,533578	0,533578	44704,90	4,49	0,0000*
Resíduos	16	0,000191	1,2E-05			
Total	17	0,533769	0,533769			

\*p ≤ 0,05 <sup>a</sup>graus de liberdade; <sup>b</sup>soma de quadrados; <sup>c</sup>quadrados médios.

**Tabela 7** – Tabela ANOVA para o método espectrofluorimétrico.

	gl <sup>a</sup>	SQ <sup>b</sup>	MQ <sup>c</sup>	Fcal	Ftab	p-valor
Regressão	1	9,8988E+10	9,8988E+10	1304,93	4,49	0,0000*
Resíduos	16	1,2137E+09	7,7857E+07			
Total	17	1,0020E+11	9,9064E+10			

\*p ≤ 0,05 <sup>a</sup>graus de liberdade; <sup>b</sup>soma de quadrados; <sup>c</sup>quadrados médios.

Como para ambos os métodos, o Fcalculado da ANOVA foi significativo e maior que o Ftabelado, não rejeitou-se a significância do modelo linear ao nível de 5%, Sendo assim, aceitou-se a hipótese alternativa de que o coeficiente angular é diferente de zero conforme preconizado pela ANVISA.

### 5.3.2.2. AVALIAÇÃO DO INTERCEPTO

A avaliação do intercepto (coeficiente linear) pode trazer informação importante a respeito do modelo linear e por isso, este também foi avaliado. É recomendado que seja verificado, por meio do Teste t, se o coeficiente linear é ou não estatisticamente diferente de zero.

Para a estatística do Teste t de Student foram testadas as seguintes hipóteses:

H0: intercepto (coeficiente linear) igual à zero;

H1: intercepto diferente de zero.

As Tabelas 8 e 9 apresentam as estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) e também a estatística t para os métodos validados:

**Tabela 8** – Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto para o método espectrofotométrico.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	0,001996	0,001503	1,3281	0,2028*
Nível	0,043307	0,000205	211,4353	0,0000*

\*p ≤ 0,05

**Tabela 9** – Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto para o método espectrofluorimétrico.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	91993,56	8028,31	11,4586	0,0000*
Nível	31152,38	862,38	36,1238	0,0000*

\*p ≤ 0,05

Para o método espectrofotométrico, o p-valor do teste t é maior que 0,05, não rejeita-se a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%, logo o coeficiente linear é igual a zero. Já para o método espectrofluorimétrico, foi obtido p-valor menor que 0,05, indicando que o coeficiente linear é diferente de zero, ou seja, a curva não passa pelo zero.

É desejado que o coeficiente linear não seja estatisticamente diferente de zero, pois caso seja, é necessário adequar o uso do método na rotina, utilizando a curva de calibração e não apenas o ponto único, como normalmente é realizado.

### 5.3.2.3. AVALIAÇÃO DA HOMOCEDESTICIDADE

Para avaliação da homocedasticidade, ou seja, se as variâncias são constantes, foi aplicado o teste de Breusch Pagan para atestar as hipóteses abaixo:

$H_0$ : variâncias dos níveis são iguais;

$H_1$ : pelo menos uma variância diferente.

A Tabela 10 apresenta os resultados do Teste de Breusch Pagan para os métodos validados.

**Tabela 10** – Avaliação da homocedasticidade.

Método	Estatística	gl	p-valor
Espectrofotométrico	2,312259	1	0,128357
Espectrofluorimétrico	0,451879	1	0,501444

Como o p-valor do Teste de Breusch Pagan, obtido para ambos os métodos foi maior que 0,05, não rejeitou-se a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Ou seja, aceitou-se a hipótese nula que diz que o modelo é homocedástico e as variâncias são constantes para todos os níveis.

A escolha do método dos mínimos quadrados a ser utilizado deve considerar variâncias dos resultados de y para cada valor de x. Dessa forma,

se a variância de  $y$  for constante (homocedasticidade), pode-se utilizar o MMQO. Caso sejam observadas alterações de variância de  $y$  (heterocedasticidade), é recomendável a utilização do MMQP, para não gerar resultados tendenciosos (ANVISA, 2017).

Sendo assim, como as variâncias apresentaram-se constantes, foi correta a utilização do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para ambos os modelos lineares.

#### 5.3.2.4. DIAGNÓSTICO DOS RESÍDUOS

Após a verificação do ajuste do modelo linear, foi realizado o diagnóstico dos resíduos. As análises estatísticas dos resíduos compreenderam os seguintes testes:

- Teste de Shapiro-Wilk para a normalidade, ou seja, para verificar se os resíduos seguem distribuição normal;
- Análise dos resíduos padronizados e/ou studentizados, para verificação de valores aberrantes ou pontos extremos na resposta;
- Avaliação da independência por meio do teste de Durbin-Watson;
- Avaliação dos pontos influentes por meio dos testes: Distância de COOK, DFBETA e DFFITS.

#### 5.3.2.5. TESTE DE SHAPIRO-WILK

Para averiguar a normalidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, conforme apresentado nas Tabelas 10 e 11, assumindo as seguintes hipóteses:

H0: resíduos seguem uma distribuição normal;

H1: resíduos não seguem uma distribuição normal.

**Tabela 11** – Teste de normalidade para o método espectrofotométrico.

	<b>Estatística</b>	<b>p-valor</b>
Shapiro-Wilk	0,954048	0,491977

**Tabela 12** – Teste de normalidade para o método espectrofluorimétrico.

	<b>Estatística</b>	<b>p-valor</b>
Shapiro-Wilk	0,969718	0,792373

Como para ambos os métodos validados, o p-valor do teste de Shapiro-Wilk é maior que 0,05, não rejeita-se a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%. Portanto, os resíduos seguem uma distribuição normal.

### 5.3.2.6. ANÁLISE DOS RESÍDUOS PADRONIZADOS E STUDENTIZADOS

A verificação dos valores extremos na resposta foi realizada através da avaliação dos resíduos padronizados (razão entre os resíduos e o desvio padrão) e dos resíduos *studentizados* (*avaliação de cada ponto individualmente*). Como critério, normalmente são considerados valores extremos na resposta as observações com resíduos padronizados e/ou *studentizados* maiores que 3 (Portal Action, 2018).

As Figuras 20 e 21 apresentam os gráficos dos resíduos padronizados e *studentizados*, respectivamente, para o método espectrofotométrico.

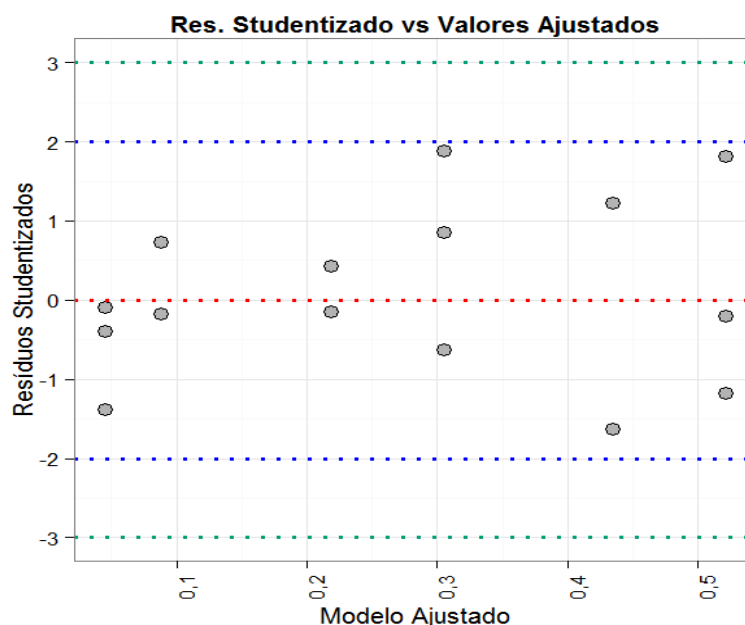
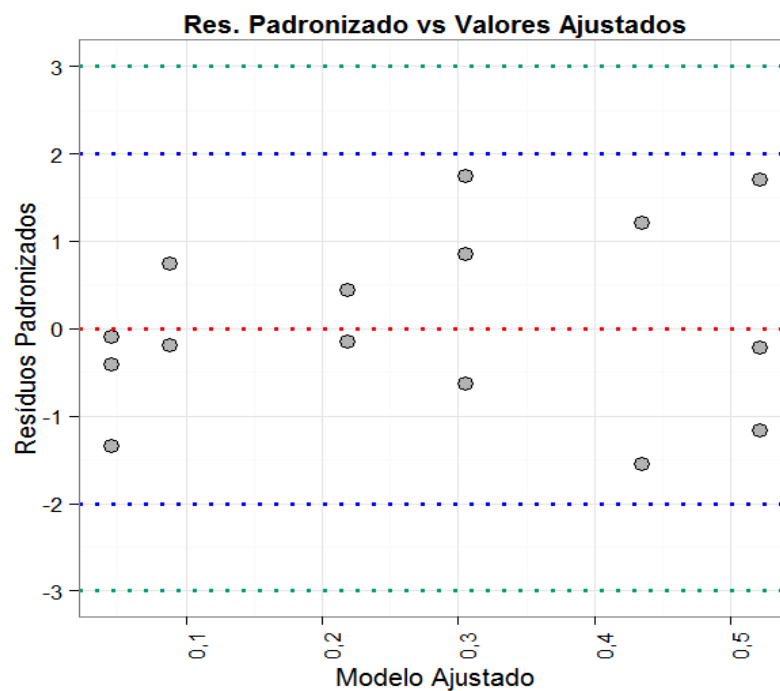
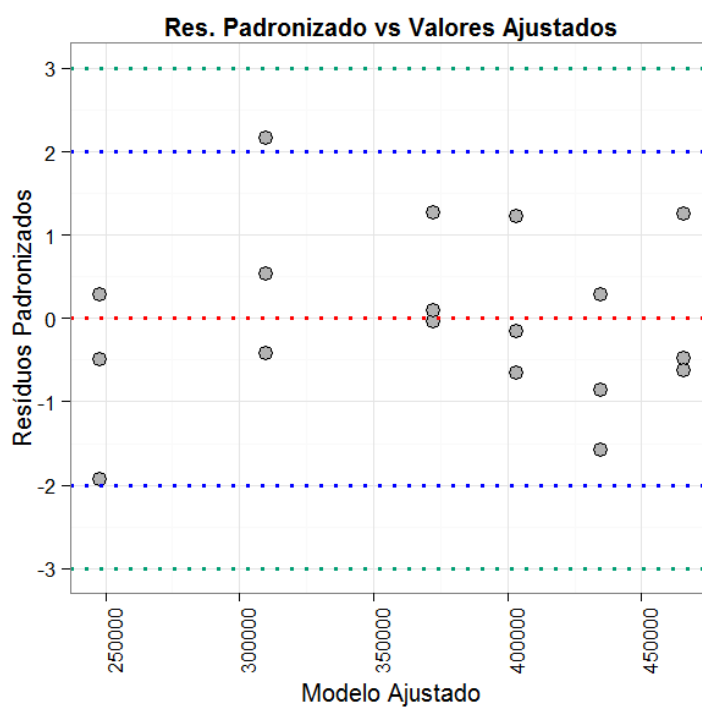
**Figura 20** – Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofotométrico.

Figura 21 – Gráfico dos resíduos studentizados para o método espectrofotométrico.

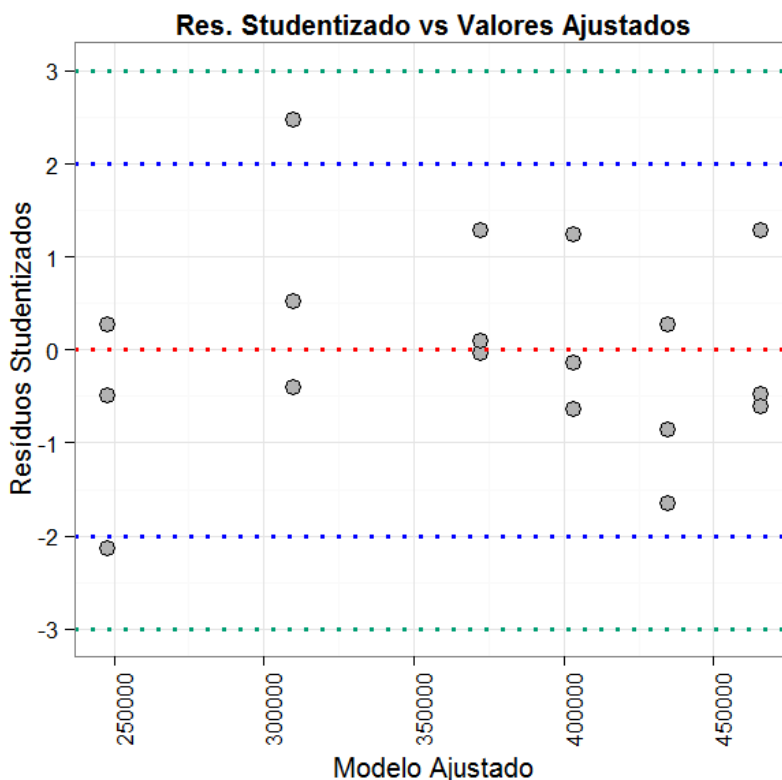


As Figuras 22 e 23 apresentam os gráficos dos resíduos padronizados e *studentizados*, respectivamente, para o método espectrofluorimétrico.

Figura 22 – Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofluorimétrico.



**Figura 23** – Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofluorimétrico.



Pela avaliação gráfica das Figuras 20, 21, 22 e 23 não foram detectados valores extremos nos resíduos, portanto, nenhuma observação apresentou grandes afastamentos das demais na série de dados, indicando que o ajuste do modelo foi equivalente para todas as observações em ambos os métodos validados.

### 5.3.2.7. TESTE DE DURBIN-WATSON

A independência das observações foi avaliada através do teste de Durbin-Watson, onde as seguintes hipóteses foram testadas:

$H_0$ : observações são independentes;

$H_1$ : observações não são independentes.

**Tabela 13** – Avaliação da independência pelo teste de Durbin-Watson.

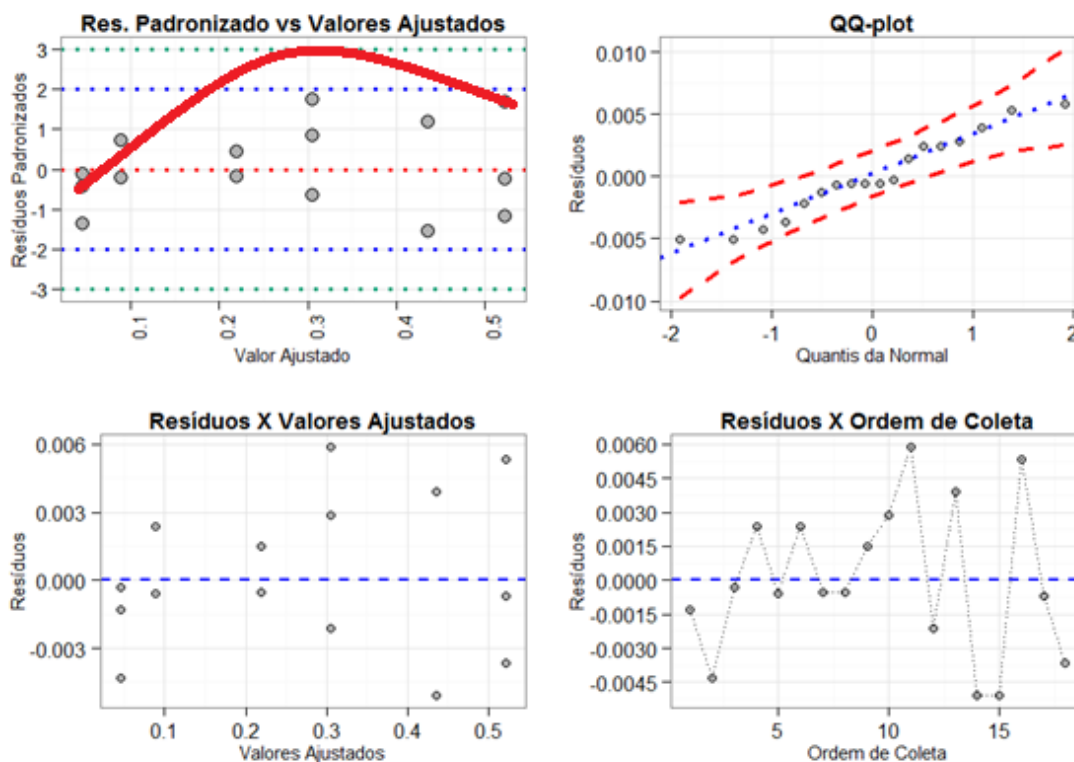
Método	Estatística	p-valor
Espectrofotométrico	2,139252	0,51464
Espectrofluorimétrico	2,380275	0,716228

Como para ambos os métodos, o p-valor do teste de Durbin-Watson foi maior que 0,05 não rejeita-se a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%, logo as observações são independentes.

Para esta avaliação, faz-se necessário que os dados sejam analisados na ordem de preparo, para não comprometer a integridade do teste. Como os mesmos apresentaram-se aleatórios em torno do eixo central, aceitou-se que as observações não seguem uma tendência, sendo, portanto independentes.

Um resumo da análise dos resíduos, de forma gráfica, é apresentado nas Figuras 24 e 25.

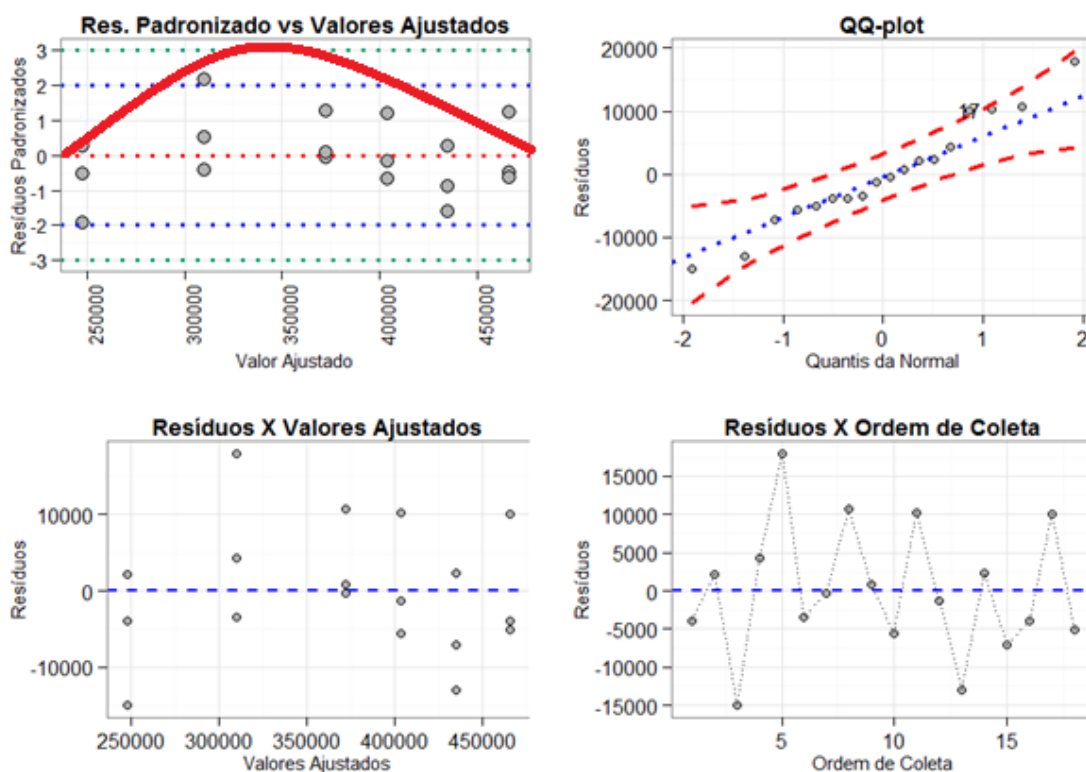
**Figura 24** – Resumo gráfico das análises de resíduos para o método espectrofotométrico.



O gráfico de Resíduos padronizados *versus* valores ajustados, em concordância com o teste de Shapiro-Wilk, afirma que os resíduos seguem uma distribuição normal, sendo o peso das caudas menores que do centro. Tanto o gráfico de QQ-Plot quanto o gráfico de Resíduos *versus* valores ajustados indicam que não há presença de valores aberrantes ou outliers, pois não apresentam formato afunilado. E por fim, o gráfico de Resíduos *versus*

ordem e coleta, avalia a independência das observações, ou seja, se não há tendência no momento ou preparo da análise, confirmando o teste de Durbin-Watson.

**Figura 25** – Resumo gráfico das análises de resíduos para o método espectrofluorimétrico.



### 5.3.2.8. AVALIAÇÃO DOS PONTOS INFLUENTES

Um ponto é denominado influente quando a sua exclusão do ajuste da regressão causa uma mudança substancial na análise de regressão (nos valores ajustados ou nas estimativas dos coeficientes do modelo). Ocasionalmente algumas observações exercem grande influência na determinação dos coeficientes de regressão do modelo e tais observações são denominadas observações influentes (Portal Action, 2018).

Um ponto influente não é necessariamente um *outlier*. A detecção de observações atípicas deve ser considerada simultaneamente com a detecção das observações que exercem grande influência na determinação dos coeficientes de regressão do modelo.

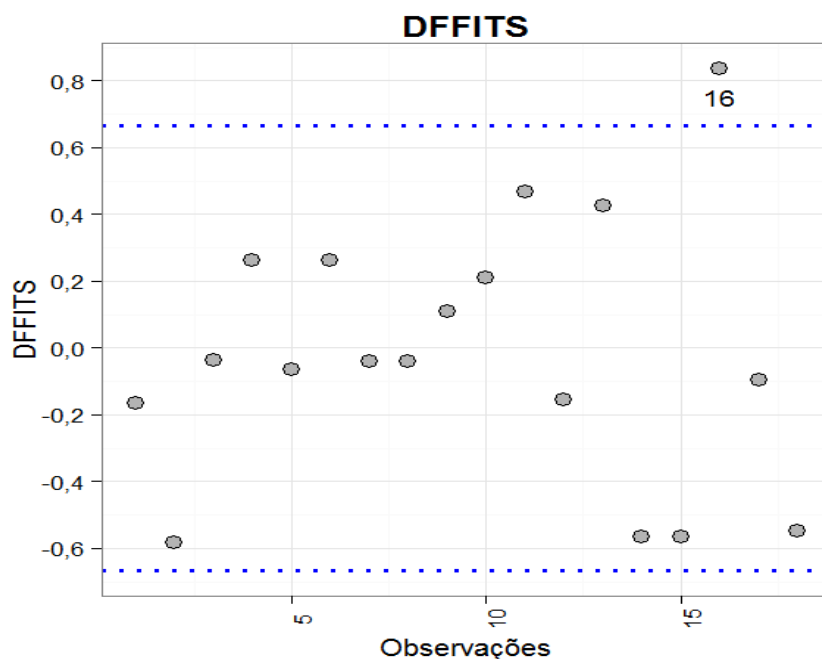
A seguir, são apresentados três tipos de pontos influentes, são eles a distância de Cook, DFBETA e DFFITS. O DFBETA avalia a influência do ponto no coeficiente angular. O DFFITS avalia a influência do ponto no ajuste da curva. A distância de Cook avalia o ponto de alavanca com o resíduo padronizado alto. Os critérios para análise dos pontos influentes são dados conforme demonstrado na Tabela 14:

**Tabela 14** – Critérios de Análise dos pontos influentes DFFITS, DCOOK e DFBETA.

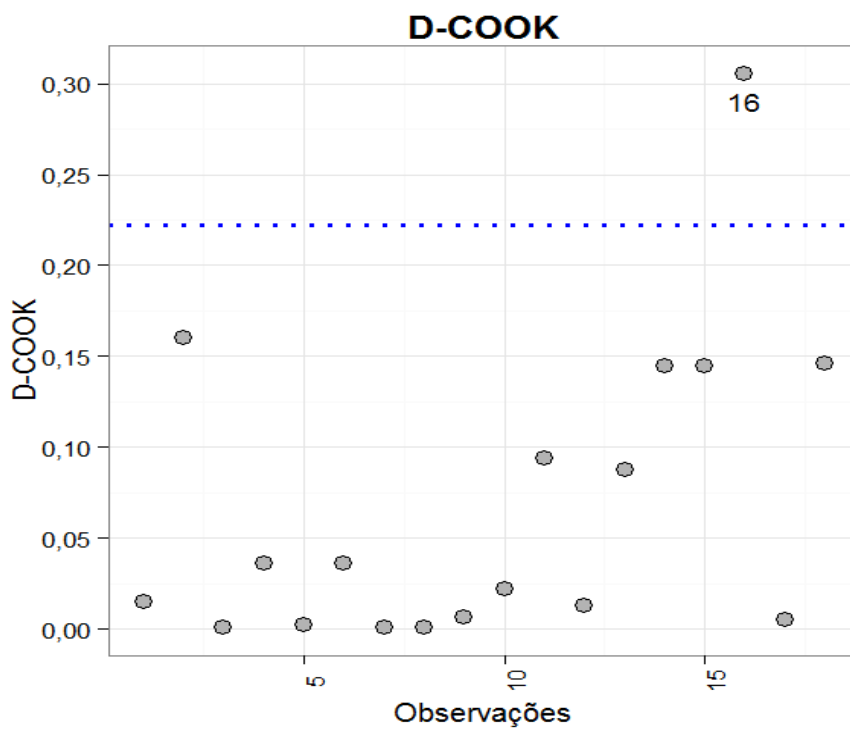
Diagnóstico	Fórmula	Valor
DFFITS	$2 * \text{raíz} ((p+1)/n)$	0,67
DCOOK	$4/n$	0,222222
DFBETA	$2/\text{raíz}(n)$	0,47

As Figuras 26, 27, e 28 apresentam os gráficos de pontos influentes DFFITS, D-COOK e DFBETA, respectivamente, para o método espectrofotométrico.

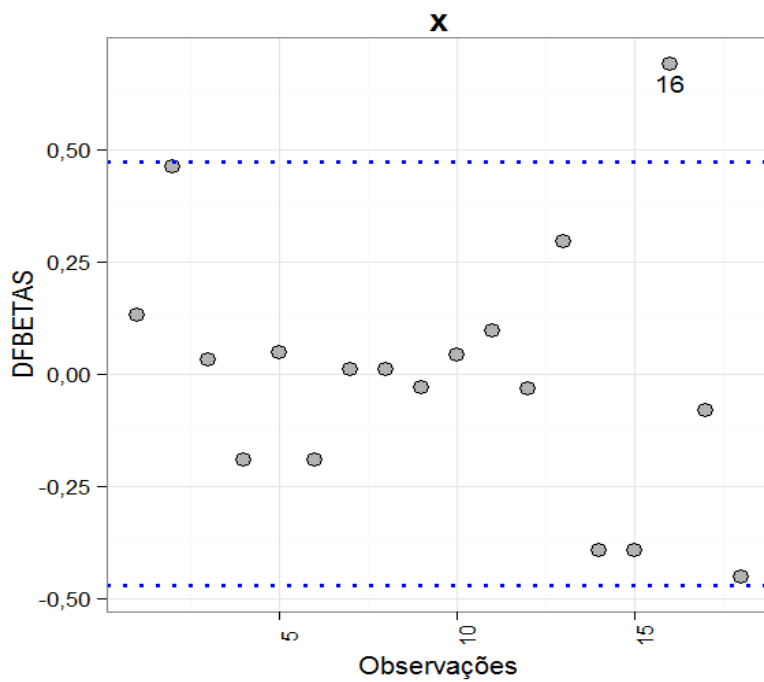
**Figura 26** – Gráfico da análise de pontos influentes DFFITS para o método espectrofotométrico.



**Figura 27** – Gráfico da análise de pontos influentes D-COOK para o método espectrofotométrico.



**Figura 28** – Gráfico da análise de pontos influentes DFBETA para o método espectrofotométrico.



De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 15, 16 e 17, para a análise de pontos de influentes, pode-se concluir que o ponto 16 apresenta influência no coeficiente angular, no ajuste da curva e na alavanca com o resíduo padronizado.

**Tabela 15** – Análise dos pontos influentes DFFITS.

Ponto	DFFITS	Critério
16	0,84	$\pm 0,67$

**Tabela 16** – Análise dos pontos influentes D-COOK.

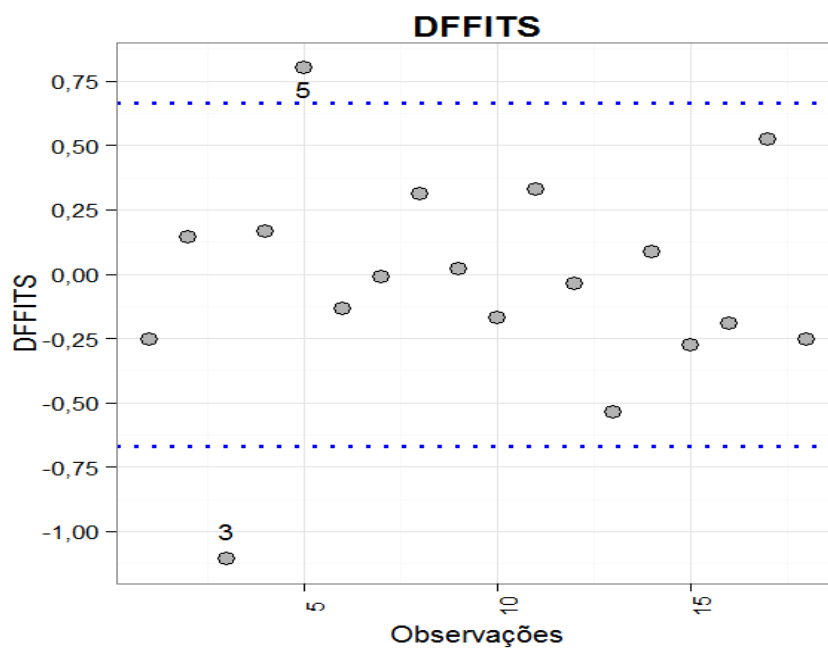
Ponto	DCOOK	Critério
16	0,305297	0,22

**Tabela 17** – Análise dos pontos influentes DFBETA.

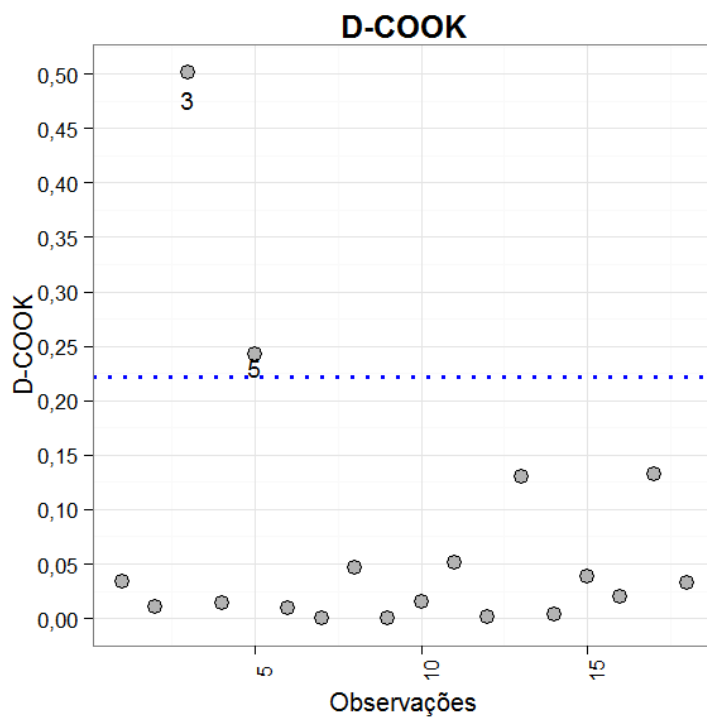
Ponto	DFBETA	Critério
16	0,690294	0,47

As Figuras 29, 30 e 31 apresentam os gráficos de pontos influentes para o método espectrofluorimétrico.

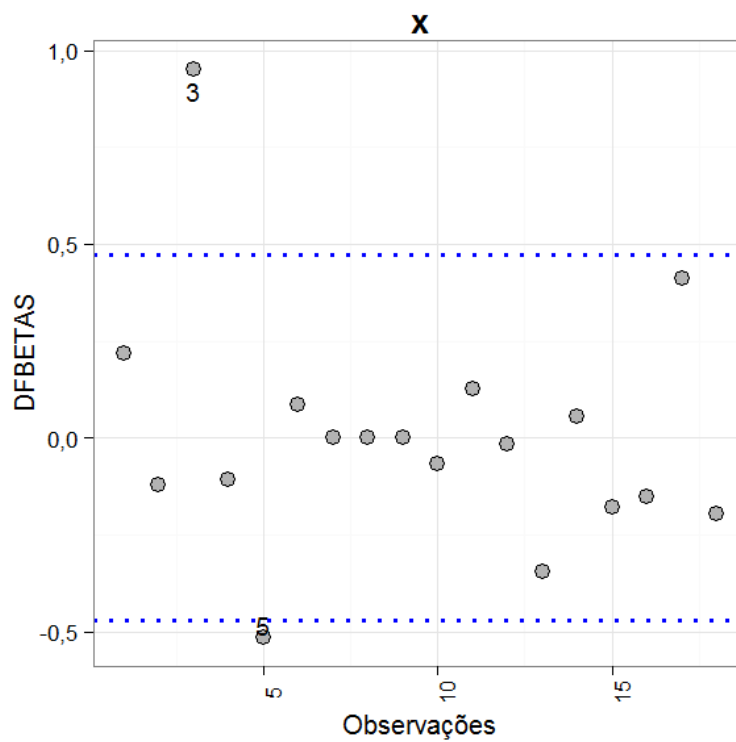
**Figura 29** – Gráfico da análise de pontos influentes DFFITS para o método espectrofluorimétrico.



**Figura 30** – Gráfico da análise de pontos influentes D-COOK para o método espectrofluorimétrico.



**Figura 31** – Gráfico da análise de pontos influentes DFBETA para o método espectrofluorimétrico.



De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 18, 19 e 20, para a análise de pontos de influentes, pode-se concluir que os pontos 3 e 5 apresentam influência no coeficiente angular, no ajuste da curva e na alavanca com o resíduo padronizado.

**Tabela 18** – Análise dos pontos influentes DFFITS para o método espectrofluorimétrico.

Ponto	DFFITS	Critério
3	-1,11	$\pm 0,67$
5	0,8	$\pm 0,67$

**Tabela 19** – Análise dos pontos influentes D-COOK para o método espectrofluorimétrico.

Ponto	DCOOK	Critério
3	0,501257	0,222222
5	0,243097	0,222222

**Tabela 20** – Análise dos pontos influentes DFBETA para o método espectrofluorimétrico.

Ponto	DFBETA	Critério
3	0,95083	0,471405
5	-0,515501	0,471405

Através da avaliação dos pontos influentes foi possível determinar quais pontos têm influência significativa na curva analítica e que por essa razão não podem ser excluídos.

### 5.3.3. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os métodos demonstraram ser sensíveis com LD de 0,15  $\mu\text{g/mL}$  e 1,35  $\mu\text{g/mL}$  para a espectrofotometria e espectrofluorimetria, respectivamente. Quanto aos LQ's foram obtidos valores de 0,47  $\mu\text{g/mL}$  para o método espectrofotométrico e de 4,10  $\mu\text{g/mL}$  para o método fluorimétrico. Através da determinação dos limites de detecção e quantificação foi possível demonstrar que os métodos possuem sensibilidade nas faixas de trabalho de 1 a 12  $\mu\text{g/mL}$  (espectrofotométrico) e 5 a 12  $\mu\text{g/mL}$  (espectrofluorimétrico).

### 5.3.4. SELETIVIDADE

Para avaliar a possível aplicação analítica dos métodos propostos, foi estudado o efeito dos excipientes comumente usados na preparação de nanocápsulas (NC) sobre os parâmetros espectroscópicos. A seletividade dos métodos foi confirmada depois de observar que os excipientes não interferiram sobre os espectros de absorção e fluorescência da QZN em 477 e 566 nm, espectrofotometria e espectrofluorimetria, respectivamente. Os valores de  $t$  calculado (Tabela 21) foram menores do que o valor crítico de  $t$  tabelado (2,776 para grau de liberdade 4 e limite de confiança de 95%). Tais resultados indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das soluções padrão de QZN contaminadas com alíquotas da formulação de NC vazia e a média de soluções padrão do analito sem contaminação ( $p > 0,05$ ). Portanto, ambos os métodos são capazes de quantificar especificamente QZN.

**Tabela 21** - Estudo de seletividade para os métodos espectrofotométricos (EFO) e espectrofluorimétrico (EFU).

Método	Concentração Teórica de QZN	Concentração* experimental da solução padrão de QZN	Concentração* da solução padrão de QZN contaminada com NC vazia	$t$ -calculado
EFO	7,00	7,05 ( $\pm 0,093$ )	6,68 ( $\pm 0,023$ )	0,017
	10,00	9,98 ( $\pm 0,106$ )	9,69 ( $\pm 0,027$ )	0,061
	12,00	12,01 ( $\pm 0,106$ )	12,21 ( $\pm 0,027$ )	0,112
EFU	9,00	9,12 ( $\pm 0,195$ )	8,28 ( $\pm 0,032$ )	0,021
	10,00	10,04 ( $\pm 0,262$ )	9,20 ( $\pm 0,006$ )	0,030
	11,00	10,81 ( $\pm 0,248$ )	10,23 ( $\pm 0,003$ )	0,057

\*Resultados são concentrações médias ( $\pm DP$ ) em  $\mu\text{g/mL}$  para três diferentes amostras.

### 5.3.5. EXATIDÃO

A exatidão dos métodos analíticos foi determinada pela adição de quantidades da NC vazia à quantidades conhecidas de QZN padrão pré-analisadas, ou seja, de concentração conhecida. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 22 e são expressos como a porcentagem de recuperação do analito adicionado e DPR (%). Como pode ser observada, a porcentagem média da recuperação foi de 97,6% a 100,5% para o método de emissão e 99,8% a 100,8% para o método de absorção, bem como DPR menor

do que 5%. Estes resultados demonstram que qualquer mudança pequena na concentração de QZN em soluções pode ser exatamente determinada pelos métodos analíticos desenvolvidos indicando um excelente acordo entre as quantidades teórica e encontradas.

**Tabela 22** - Resultados para a determinação da exatidão do método espectrofluorimétrico e espectrofotométrico.

Método	QZN Teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	QZN Obtida ( $\mu\text{g/mL}$ )*	Recuperação (%)**	DPR (%)
Espectrofluorimétrico	9	9,04	100,5 ( $\pm 3,10$ )	3,1
	10	9,96	99,6 ( $\pm 3,23$ )	3,2
	11	10,73	97,6 ( $\pm 2,70$ )	2,8
Espectrofotométrico	7	7,05	100,8 ( $\pm 1,33$ )	1,3
	10	9,98	99,8 ( $\pm 1,06$ )	1,1
	12	12,01	100,1 ( $\pm 0,88$ )	0,9

\*Resultados são concentrações médias ( $\pm$ DP) para três diferentes amostras.

\*\*Resultados são médias ( $\pm$ DP) para três diferentes amostras.

### 5.3.6. PRECISÃO

A precisão foi determinada pelo estudo em dois níveis: repetibilidade (análises intradia) e precisão intermediária (análises interdia). Foram preparadas soluções contendo o corante quinizarina na presença dos excipientes (nanocápsulas vazias) em 3 níveis de concentração: 9,00; 10,00 e 11,00  $\mu\text{g/mL}$  para o método espectrofluorimétrico e 7,00; 10,00 e 12,00  $\mu\text{g/mL}$  para o método espectrofotométrico.

Para o método espectrofotométrico, as análises intradia revelaram desvio padrão relativo (DPR) de 2,93%, enquanto que para o método espectrofluorimétrico o DPR foi de 0,72%, para 9 determinações cada um ( $n=9$ ), conforme demonstrado nas Tabelas 23 e 24, respectivamente. Conforme a literatura o limite máximo especificado para o nível de concentração do analito utilizado é de 5% (referência).

A precisão intermediária foi expressa como a variação intralaboratorial em dois dias diferentes preparada por dois analistas. Em ambos os métodos, os valores de DPR foram menores do que 5%, conforme demonstrado nas Tabelas 23 e 24. O DPR ( $n=18$ ) foi de 0,87 e 2,31 %, em dias diferentes para espectrofotometria e espectrofluorimetria, respectivamente. Portanto, os resultados da precisão indicam a proximidade de acordo entre as várias

medidas de quantificação da QZN realizadas sobre as mesmas condições operacionais durante um curto intervalo de tempo, bem como durante um longo período de tempo e com diferentes analistas.

**Tabela 23** - Resultados para a determinação da precisão do método espectrofluorimétrico.

Precisão	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração (%)	Média $\pm$ DPR (%) (n=9)
Repetibilidade	8,99	99,89	99,20 $\pm$ 2,93
	9,34	103,78	
	8,79	97,67	
	9,82	98,20	
	10,33	103,30	
	9,73	97,30	
	10,58	96,18	
	11,07	100,64	
	10,54	95,82	
Intermediária	9,12	101,33	100,47 $\pm$ 1,36
	9,24	102,67	
	9,01	100,11	
	9,98	99,80	
	10,18	101,80	
	9,87	98,70	
	10,89	99,00	
	11,15	101,36	
	10,94	99,45	
<b>Média <math>\pm</math> DPR (%) (n=18)</b>			<b>99,83 <math>\pm</math> 2,31</b>

**Tabela 24** - Resultados para a determinação da precisão do método espectrofotométrico.

Precisão	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração (%)	Média $\pm$ DPR (%) (n=9)
Repetibilidade	7,02	100,29	100,23 $\pm$ 0,72
	7,1	101,43	
	6,99	99,86	
	10,11	101,10	
	10,01	100,10	
	9,92	99,20	
	12,08	100,67	
	11,98	99,83	
	11,95	99,58	
Intermediária	7,07	101,00	100,22 $\pm$ 1,05
	7,14	102,00	
	6,95	99,29	
	10,09	100,90	
	9,96	99,60	
	9,89	98,90	
	12,13	101,08	
	11,99	99,92	
	11,92	99,33	
<b>Média <math>\pm</math> DPR (%) (n=18)</b>			<b>100,23 <math>\pm</math> 0,87</b>

## **5.4. RENDIMENTO EXPERIMENTAL DE ASSOCIAÇÃO DO CORANTE QUINIZARINA**

Após o desenvolvimento e validação dos métodos espectroanalíticos foi realizada a quantificação do corante QZN na formulação através da curva analítica de calibração para ambos os métodos. As curvas de calibração foram elaboradas a partir das técnicas de espectrofotometria e espectrofluorimetria conforme descrito na seção experimental (4.3.4).

As soluções de trabalho foram preparadas conforme seção experimental 3.3.9, obtendo concentração teórica de 10 µg/mL, sendo a quantidade de corante dosada nas mesmas condições experimentais do protocolo padrão.

A técnica por espectroscopia de absorção possibilitou calcular um rendimento de 82%, enquanto que a técnica por espectroscopia de emissão por fluorescência 101%, demonstrando que ambos os métodos permitem a quantificação do corante após associação a nanocarreadores, no entanto, possuem sensibilidades diferentes.

## **6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **6.1. CONCLUSÃO**

A realização do estudo espectroscópico possibilitou comparar ambos os compostos, quinizarina sintética e corante vermelho de origem biotecnológica, demonstrando as propriedades fotofísicas muito semelhantes, o que colabora ainda mais para a utilização da quinizarina como um composto padrão para a quantificação do corante vermelho pelos métodos espectroanalíticos descritos neste trabalho.

A partir dos dados obtidos foi possível concluir que os métodos espectroanalíticos desenvolvidos possuem linearidade satisfatória, pois, em ambos, o coeficiente de correlação apresentou-se na ordem de 0,99, dessa forma é possível obter a concentração real do composto associado à sistemas nanocarreadores. O ajuste do modelo linear adequado também foi comprovado por meio da análise de resíduos demonstrado através dos testes estatísticos.

Os limites de detecção e quantificação demonstraram que os métodos possuem boa sensibilidade. Ambos os métodos validados foram considerados

seletivos tendo em vista que nenhum dos componentes do sistema nanocarreador apresenta interferência direta nos parâmetros utilizados pelo método.

Os métodos também foram considerados precisos e exatos, haja vista que o DPR não foi superior a 5% para o ensaio de precisão, em ambos os métodos e a recuperação apresentou-se dentro da faixa de 99,8% a 100,8% para o método espectrofotométrico e 97,6% a 100,5% para o método espectrofluorimétrico, dentro dos valores especificados na literatura (MORETTO; CALIXTO, 2016).

Dessa forma, conclui-se que os compostos de interesse possuem propriedades fotofísicas esperadas, assim como os métodos espectroanalíticos validados são adequados ao uso na rotina de controle de qualidade do corante sintético quinizarina e seus derivados, podendo ser um atrativo em complementação ou substituição aos métodos cromatográficos convencionais.

## **6.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O desenvolvimento dos métodos espectroanalíticos em substituição aos métodos cromatográficos, comumente utilizados na rotina do controle de qualidade de produtos farmacêuticos, possibilitou garantir resultados mais rápidos e com menor gasto de tempo, além da utilização de um menor volume de solventes durante o preparo das amostras.

Sendo assim, este trabalho contribuiu para a elaboração de um procedimento operacional padrão para realização de análises de controle de qualidade de corantes sintéticos derivados de antraquinonas nanoencapsulados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, M. S. M. et al. Análise da produção científica brasileira sobre nanotecnologia e saúde. **RECIIS** – Rev. Eletrôn. Comum. Inf. Inov. Saúde, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2017.

AHN, Kwang-Duk et al. Fluorescent photoimaging with polymers having protected quinizarin dye precursors by a dry process based on chemical amplification. **Reactive and Functional Polymers**, v. 69, n. 2, p. 111-116, 2009.

AL-OTAIBI, J. S.; SPITTLE, P. T.; EL GOGARY, Tarek M. Interaction of anthraquinone anti-cancer drugs with DNA: Experimental and computational quantum chemical study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1127, p. 751-760, 2017.

ALVES, L. D. S. et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE et al. Is my calibration linear?. **Analyst**, v. 119, n. 11, p. 2363-2366, 1994.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5ª ed. Brasília, 2010.

BARBOZA, F. M. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 747-749, 2010.

BATISTA, C. M; DE CARVALHO, C. M. B; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BIZERRA, Alex; SILVA, Viviane. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.

BOULAIZ, H. et al. Nanomedicine: application areas and development prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3303-3321, 2011.

BRASIL, 2017. Resolução RDC nº 166/2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 24 de julho de 2017.

CHAPTER, General. 1225, **Validation of compendial methods**. In: United States Pharmacopeia 30, National Formulary 25. Rockville, Md.: USA, The United States Pharmacopeial Convention. 2007.

COLOUR INDEX. **Definitions of a dye and a pigment.** Disponível em <<https://colour-index.com/definitions-of-a-dye-and-a-pigment> > Acesso em: 15 de agosto de 2018.

DAHIYA, P. et al. Photophysical properties of 1-N-methylamino-and 1-N, N-dimethylamino-9, 10-anthraquinone dyes: a comparison with 1-amino-9, 10-anthraquinone dye. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 186, n. 2-3, p. 218-228, 2007.

DE AZEVEDO, M. M. M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulado violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas.** 7,8p. Tese (doutorado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DE MACEDO, E.M. S. et al. Quimiodiversidade e Propriedades Biofarmacológicas de Espécies de Senna Nativas do Nordeste do Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 169-195, 2016.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química nova. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DUVAL, J. et al. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: a review. **Industrial crops and products**, v. 94, p. 812-833, 2016.

FENG, Lan; MUMPER, Russell J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. **Cancer letters**, v. 334, n. 2, p. 157-175, 2013.

FIGUEIRAS, A. R. R.; COIMBRA, A. B.; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14, 2014.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, p. 488-492, 2009.

GANESAN, P; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37-56, 2017.

GIL, E. de S. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 3. ed. **São Paulo: Pharmabooks**, 2007. p. 103-104

GHOLIVAND, M. B.; KASHANIAN, S.; PEYMAN, H. DNA-binding, DNA cleavage and cytotoxicity studies of two anthraquinone derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 87, p. 232-240, 2012.

GONZÁLEZ, A. G. et al. The correlation coefficient attacks again. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, n. 5, p. 256-258, 2006.

- HTUN, M. Than. Photophysical study on daunorubicin by fluorescence spectroscopy. **Journal of Luminescence**, v. 129, n. 4, p. 344-348, 2009.
- HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human & experimental toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (ED.). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Volume 100 F – A Review of Human Carcinogens. 2012.
- ICH: International Conference on Harmonisation. Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, nov.2005.
- INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial -. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQCGCRE-008. 2003.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York, NY: Kluwer Academic, 1999.
- MACHATOVÁ, Z. et al. Study of natural anthraquinone colorants by epr and uv/vis spectroscopy. **Dyes and Pigments**, v. 132, p. 79-93, 2016.
- MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2216-2229, 2008.
- MORETTO, L.D.; CALIXTO, J. **Qualificações e Validações: Guia Sindusfarma para a Indústria Farmacêutica**. Sindusfarma, 2016.
- PORTAL ACTION. ESTATCAMP – Consultoria Estatística e Qualidade, por DIGUP – Desenvolvimento de Sistemas e Consultoria Estatística. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/>>. Acesso em out. de 2018.
- PRIMO, F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo in vitro de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- RIGON, Cristina et al. Sistemas nanoestruturados contendo óleo de linhaça: desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas. **Saúde (Santa Maria)**, v. 43, n. 1, p. 153-161, 2017.
- ROCHA, F. R. P; TEIXEIRA, L; S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.
- ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SABATINI, C. A. **Investigação da hidrólise enzimática de derivados da quinizarina por espectroscopia e microscopia de fluorescência**. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SANTOS, R. N. dos; SILVA, M. G. de V; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae): Chemical constituents isolated from the wood of *Senna reticulata* Willd. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1979-1981, 2008.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**. São Paulo. v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHERJE, A. P. et al. Dendrimers: a versatile nanocarrier for drug delivery and targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 707-720, 2018.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. de. **Nanocarreadores contendo ftalocianina de cloroalumínio: desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação in vitro da fotocitotoxicidade em melanoma**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição Norte Americana. São Paulo: Thomson, 2006.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, p. 1755-1774, 2008.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A. Preparation of polymeric nanoparticles from pre-formed polymers: part II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SQUILLARO, T. et al. Nano-delivery systems for encapsulation of dietary polyphenols: an experimental approach for neurodegenerative diseases and brain tumors. **Biochemical pharmacology**, v. 154, p. 303-317, 2018.

United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); **General Principles of Validation**, Rockville, 1987.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular fluorescence: principles and applications**. 2nd. ed. Weinheim, Germany: John Wiley & Sons, 2012.

ZANONI, M. V. B; YAMANAKA, H. **Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.

WEINERT, P. L; PEZZA, L; PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, p. 1112-1116, 2008.