



Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO –UFOP
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



DAIANE APARECIDA SEVERINO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS
DESTINADOS AO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE OCULAR**

OURO PRETO

2019

DAIANE APARECIDA SEVERINO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS
DESTINADOS AO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE OCULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso de apresentado à
Universidade Federal de Ouro Preto como
requisito obrigatório para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Gisele Rodrigues da Silva

Ouro Preto

2019

S497d

Severino, Daiane Aparecida.

Desenvolvimento de sistemas poliméricos nanoparticulados destinados ao tratamento da toxoplasmose ocular [manuscrito] / Daiane Aparecida Severino. - 2019.

48f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Rodrigues da Silva.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Toxoplasmose ocular. 2. Nanopartículas. 3. Antibióticos. I. Silva, Gisele Rodrigues da. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.99

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

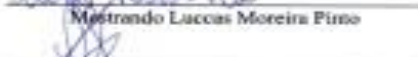
Escola de Farmácia



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 445ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 04 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, quinta-feira, realizou-se, a partir das 13 horas e 30 minutos, na sala 2 da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia da candidata ao grau de Farmacêutico Generalista, **Daiane Aparecida Severino**, matrícula 13.2.2307, intitulada **Desenvolvimento de sistemas poliméricos nanoparticulados destinados ao tratamento da toxoplasmose ocular**. A Banca Examinadora foi constituída pelo Mestrando Luccas Moreira Pinto, CIPHARMA/EF/UFOP, pelo Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, DEFAR/EF/UFOP e pela orientadora Profa Dra. Gisele Rodrigues da Silva, DEFAR/EF/UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 95. Comunicou-se à candidata que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca, com o aval escrito da orientadora. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 04 de julho de 2019.


Profa Dra. Gisele Rodrigues da Silva
(orientadora)


Mestrando Luccas Moreira Pinto


Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos


Profa Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me fortalecido ao ponto de superar as dificuldades e também por toda saúde que me deu e que permitiu alcançar esta etapa tão importante da minha vida.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Por nunca medirem esforços para a concretização dos meus sonhos.

A minha família que nunca desistiram de mim e sempre me ofereceram amor eu deixo uma palavra e uma promessa de gratidão eterna.

As minhas amigas, Dani, Juliana e Renata pela amizade, carinho, compreensão, por sempre se fazerem presentes mesmo distante fisicamente, por sempre me encorajarem e acreditarem em mim mesmo quando eu mesma não achava ser possível. Minha eterna gratidão a vocês.

A minha família Ouro Pretana, eterno ap103 pelos anos de convivência, companheirismo, paciência e sobretudo amizade. Vocês contribuíram para que os anos em Ouro Preto se tornassem mais amenos quando a saudade e as dificuldades surgiam, obrigada pela amizade, torcida e carinho, não poderia ter escolhido uma família melhor.

As amigas que conquistei durante o curso e com certeza serão pra vida toda, Luísa, Maria Alice, Renata, Rozana, Valeska e Xau. Obrigada por tudo, vocês fizeram toda diferença.

A minha orientadora Profa. Dra. Gisele, agradeço pela sua disponibilidade e incentivo que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Saliento o apoio incondicional prestado, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento tanto pessoal como profissional. Serei eternamente grata por todo o apoio.

Aos colegas do LDGnano por disponibilizarem o laboratório para a realização experimental do meu trabalho, em especial Luccas e Mateus por toda ajuda e disponibilidade.

Aos laboratórios: Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto e Laboratório de Biotecnologia Ambiental desta mesma instituição, por permitirem que fossem feitas análises de caracterizações físico químicas e eficiência de encapsulação, minha eterna gratidão.

Aos professores eu agradeço a orientação incansável, o empenho e a confiança que ajudaram a tornar possível este sonho tão especial.

A esta universidade e a toda sua direção eu deixo uma palavra de agradecimento por todo ambiente inspirador e pela oportunidade de concluir este curso.

A todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte do meu percurso eu agradeço com todo meu coração.

RESUMO

A toxoplasmose ocular é uma infecção intraocular que pode resultar em danos irreversíveis, como a perda completa da visão. O tratamento da toxoplasmose ocular é limitado devido à dificuldade em transportar doses efetivas do fármaco presente na circulação sanguínea para o interior do olho. Isto ocorre devido à anatomia ocular que apresenta duas barreiras: retiniana e hemato-aquosa. Para contornar estas barreiras oculares que impedem a penetração dos fármacos no olho, sistemas intraoculares de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos. Estes sistemas podem ser representados por sistemas poliméricos nanoparticulados incorporados com fármacos, tais como a espiramicina. Estas nanopartículas podem ser injetadas no interior do olho, ultrapassando a barreira hemato-retiniana, permitindo uma liberação prolongada e em concentrações terapêuticas do fármaco, levando ao aumento da eficácia terapêutica e a redução de efeitos colaterais. A espiramicina possui importante atividade anti-inflamatória e antiparasitária. Diante disto, nanopartículas constituídas de polímero poli(ϵ -caprolactona) contendo o fármaco espiramicina representam uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da toxoplasmose ocular. As nanopartículas foram desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação utilizando o delineamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central. Tais sistemas foram caracterizados através da análise de tamanho, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ). Selecionou-se a formulação otimizada que apresentava 164,47 nm de diâmetro, 0,094 de IP, -26,13 de PZ. Foi desenvolvido um método espectrofotométrico para determinar a eficiência de encapsulação da espiramicina pelas nanopartículas. Na análise de porcentagem de encapsulação da espiramicina foi 70% a 85%. Em conclusão, estes resultados sugerem que os sistemas nanoparticulados desenvolvidos são promissores no direcionamento do fármaco para o tratamento localizado da toxoplasmose ocular.

Palavras-chave: Espiramicina, nanopartículas, nanoesferas, toxoplasmose ocular.

ABSTRACT

Ocular toxoplasmosis is an intraocular infection which can result in irreversible damage, such as complete loss of vision. Treatment of ocular toxoplasmosis is limited because of the difficulty in transporting effective doses of the drug present in the bloodstream into the eye. This occurs due to the ocular anatomy that presents two barriers: retinal and blood-aqueous. To circumvent these ocular barriers that prevent drug penetration into the eye, intraocular drug delivery systems have been developed. These systems may be represented by nanoparticulate polymer systems incorporated with drugs, such as spiramycin. These nanoparticles can be injected into the eye, bypassing the blood-retinal barrier, allowing prolonged release and therapeutic drug concentrations, leading to increased therapeutic efficacy and reduced side effects. Spiramycin has important anti-inflammatory and antiparasitic activity. In view of this, nanoparticles consisting of poly (ϵ -caprolactone) polymer containing the drug spiramycin represent a promising therapeutic alternative for the treatment of ocular toxoplasmosis. The nanoparticles were developed by the nanoprecipitation method using the 2^3 factorial design with replicates at the central point. These systems were characterized by size, polydispersity (PI) and zeta potential (PZ) analysis. A spectrophotometric method was developed to determine the encapsulation efficiency of the spiramycin by the nanoparticles. In the percentage encapsulation analysis of spiramycin, it was 70% to 85%. In conclusion, these results suggest that the nanoparticulate systems developed are promising in targeting the drug for localized treatment of ocular toxoplasmosis.

Keywords: Spiramycin, nanoparticles, nanospheres, ocular toxoplasmosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>T.gondii</i>	18
Figura 2 - Estrutura química da Espiramicina	24
Figura 3 - Representação esquemática de nanoesfera. a) Fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas. b) Fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.	26
Figura 4 –Estrutura química da Policaprolactona.....	27
Figura 5 – Estrutura química do Tween 80.....	29
Figura 6. Representação esquemática do método de nanoprecipitação.....	31
Figura 7 - Espectros de absorção na região do UV/Vis (200 a 450 nm) de soluções ESP (105µg/mL), PCL (3947 µg/mL), Tween 80 (15 µg/mL) em acetona (1:1)	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes alteradas para a realização do delineamento fatorial 2 ³ com réplicas no ponto central.	31
Tabela 2 - Matriz de planejamento fatorial 2 ³ com réplicas no ponto central aplicado ao desenvolvimento das nanopartículas à base de espiramicina e PCL, classificadas como formulações 1 a 9, em que as variáveis independentes massa de espiramicina; concentração do tensoativo Tween80 e concentração do polímero PCL foram modificados deliberadamente .	32
Tabela 3- Valores de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta obtidos para as nanopartículas das formulações 1 a 9 realizando-se o delineamento fatorial.....	37
Tabela 4 - EE da ESP nas 9 formulações de nanopartículas obtidas a partir da modificação das seguintes variáveis independentes: massa da ESP, massa do polímero PCL e concentração de Tween 80	41

LISTA DE SIGLAS

AIDS – acquired immuno deficiency syndrome (tradução em português: Síndrome da Imunodeficiência adquirida)

ANOVA – Análise da variância

BHE - Barreira hemato encefálica

EE –Eficiência de Encapsulação

ESP – Espiramicina

FDA - Food and Drug Administration

IL – Interleucinas

INF -Interferon

IP – Índice depolidispersão

Mrp2 –Transportadores de efluxo de proteínas multirresistentes do tipo 2

PCL –poli- ϵ -caprolactona

PEG – polietilenoglicol

PGA – Ácido glicólico

PLA – Ácido polilático

PH - Potencial Hidrogeniônico

PZ – Potencial Zeta

SUS – Sistema Único de Saúde

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UV/Vis - Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1Toxoplasmose	17
3.1.1Toxoplasmose Ocular.....	18
3.1.2 Tratamento da Toxoplasmose.....	19
3.2 Nanotecnologia.....	21
3.3 Espiramicina.....	22
3.4 Nanoesferas.....	25
3.4.1 Polímero PCL.....	26
3.4.2 Tensoativo - Tween 80.....	27
3.4.2.1 Classificação dos tensoativos.....	27
4. MATERIAIS	29
4.1. Substâncias químicas e polímero	29
4.1.2. Reagentes e vidrarias.....	30
4.1.3. Equipamentos	30
5. METODOLOGIA.....	30
5.1 Preparo das nanopartículas poliméricas – formulação piloto	30
5.2. Planejamento experimental para o desenvolvimento de nanopartículas utilizando delineamento fatorial 2 ³ com réplicas no ponto central	31
5.3 Determinação do diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta	32
5.4 Avaliação estatística por ANOVA das formulações obtidas no delineamento fatorial ..	33
5.5 Porcentagem e eficiência de encapsulação	33
5.5.1 Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria UV/Vis para quantificação de ESP nas nanopartículas	34
5.5.1.1 Preparo de soluções utilizadas no desenvolvimento do método analítico	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

6.1 Desenvolvimento das nanopartículas de espiramicina constituídas do polímero PCL...	35
6.2 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas após o delineamento fatorial 2^3	37
6.3 Porcentagem e eficiência de encapsulação da Espiramicina	41
7. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose ocular é uma doença provocada pelo *Toxoplasma gondii* (COMMODARO *et al.*, 2003), um parasita intracelular obrigatório, demarcada por uma inflamação da retina e da coróide (retinocoroidite), a qual tem sido apontada como uma das predominantes causas de uveíte posterior infecciosa no mundo (OZGONUL; BESIRLI, 2017).

A efetividade no tratamento de uma doença necessita de um transporte eficiente de doses adequadas dos agentes farmacológicos exclusivamente nos locais acometidos. O tratamento convencional da toxoplasmose ocular consiste na aplicação oral de pirimetamina e sulfadiazina, os quais podem estar associados ou não à clindamicina, espiramicina e corticosteroides (SOHEILIAN *et al.*, 2011; ROBERT-GANGNEUX, 2014; MONTAZERI *et al.*, 2018).

Todavia, tais fármacos podem desencadear efeitos adversos e/ou tóxicos sistêmicos. Além disso, estes fármacos, disseminados sistemicamente, não alcançam, em quantidades terapêuticas, o interior do olho devido à existência de duas barreiras oculares denominadas hematorretiniana e hematoaquosa, as quais impossibilitam/reduzem a penetração do princípio ativo no olho (ALDAY; DOGGETT, 2017).

Um tratamento alternativo para a toxoplasmose ocular é a administração de injeções intraoculares de antibióticos e anti-inflamatórios (MAZZA *et al.*, 2018). Todavia, estas injeções podem resultar em um aumento da pressão intraocular, hemorragias e deslocamento da retina (MELLO *et al.*, 2010). Fármacos administrados na cavidade vítrea através de injeções são rapidamente eliminados desta região, visto que o sistema de depuração é eficiente, resultando em um menor tempo de meia vida dos fármacos, o qual não garante a completa erradicação do parasita intraocular (CHOUDHURY *et al.*, 2015).

Para contornar as desvantagens referentes a administração sistêmica de fármacos e das injeções intraoculares, sistemas de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos visando o tratamento local da toxoplasmose ocular. Tais sistemas podem ser constituídos por polímeros biodegradáveis, incorporados de fármacos, o qual apresenta dimensões nanométricas (PARK *et al.*, 2019).

Esses sistemas poliméricos podem ser inseridos no interior do olho, transpondo as barreiras hemato-retiniana e hemato-aquosa, permitindo assim a liberação do fármaco por tempo prolongado e em concentrações que estejam compreendidas na faixa terapêutica (SAMY *et al.*, 2019). Como o fármaco será liberado continuamente no local de ação, diminui-se a probabilidade de efeitos colaterais e/ou tóxicos sistêmicos referentes à administração do fármaco.

Diante do exposto, no presente trabalho foram elaborados sistemas nanométricos constituídos por poli(ϵ -caprolactona) (PCL), um polímero biodegradável e biocompatível, e espiramicina, um fármaco que atua contra o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), destinados ao tratamento localizado do processo infeccioso ocular induzido por este parasita.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver e caracterizar sistemas poliméricos nanoparticulados destinados ao tratamento da toxoplasmose ocular.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolvimento farmacotécnico de sistemas nanoparticulados contendo PCL e espiramicina (formulação piloto);
- ✓ Otimização da formulação piloto por meio do planejamento experimental fatorial 2^3 com réplicas no ponto central;
- ✓ Determinação das características físico-química da nanoesfera por meio da análise de tamanho, índice de polidispersão e carga superficial (potencial zeta);
- ✓ Análise estatística (ANOVA) a fim de verificar se as variáveis premeditadamente alteradas para a elaboração das formulações do delineamento fatorial exercem influência significativa no tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.
- ✓ Determinação da eficiência de encapsulação da espiramicina nos sistemas nanoparticulados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Toxoplasmose

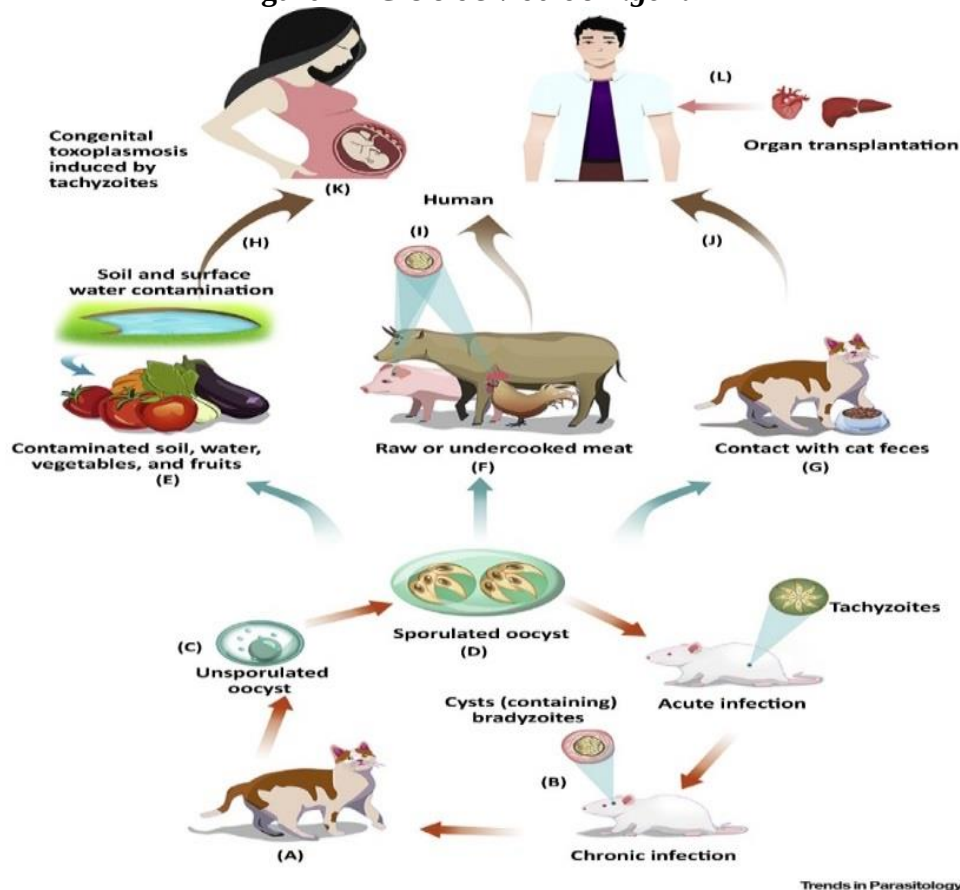
A infecção por *T. gondii* apresenta significativos impactos econômicos e sociais (WANG *et al.*, 2017). Este parasita pode contaminar todos os animais vertebrados inclusive humanos (WHITE *et al.*, 2014). Em indivíduos imunocomprometidos, como na AIDS ou em pacientes com câncer, a infecção por este parasita pode ocasionar encefalite grave e retinocoroidite (HERRMANN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017). Além do mais, a infecção congênita por este parasita tem sido apontada como uma das principais causas de aborto espontâneo, nascimento prematuro ou até mesmo doenças significativas no recém-nascido (MONTROYA; LIESENFELD, 2004)

Pertencente ao filo Apicomplexa, o *T.gondii* encontra-se sob três fases infecciosas básicas do ciclo de vida: esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos. O esporozoíto é a forma que se encontra dentro de oocistos esporulados que são ingeridos do ambiente. O taquizoíto é a forma de crescimento mais rápida e é responsável por propagar a infecção dentro de um hospedeiro. Por fim, o bradizoíto é a forma que se divide lentamente em cistos teciduais, que por sua vez, são responsáveis pela infecção crônica (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; GUITON *et al.*, 2017).

Gatos e outros felídeos servem como hospedeiros definitivos gerando oocistos, forma ambientalmente resistente achada nas fezes de gatos infectados propagada pela ingestão, causando uma infecção que se transforma em taquizoítos, a forma mais ágil de replicação deste organismo que se propaga por todo o corpo, estes podem disseminar infecção se forem injetados em um hospedeiro (como por exemplo em um acidente de laboratório ou através de uma transfusão de sangue). Já os bradizoítos, encontram-se inicialmente em cistos teciduais no músculo e cérebro do hospedeiro intermediário e, quando ingeridos estes causam a modificação da infecção em bradizoítas (Esquema simplificado na Figura 1). Todas as formas encontram-se em tamanho próximo de 2 a 6 µm de largura e 4 a 8 µm de comprimento, a extremidade anterior é composta por organelas secretoras, conhecida como complexo apical que são utilizadas na invasão. A locomoção advém de um processo chamado de motilidade de deslizamento, mecanismo fundamentado em actina que é essencial para a migração de parasitas através dos tecidos através das barreiras biológicas na invasão e saída de células

hospedeiras (SIBLEY; HÅKANSSON; CARRUTHERS, 1998; SOLDATI; MEISSNER, 2004; BULLEN *et al.*, 2009; DAHER *et al.*, 2010).

Figura 1 - Ciclo de vida do *T.gondii*



Fonte: WANG *et al.*, 2019

Integrantes da família felina são os hospedeiros definitivos do organismo, ao passo que humanos e demais espécies podem servir como hospedeiros intermediários. O contágio por humanos transcorre por três vias principais: (1) ingestão de carne infectada crua ou cozida inadequadamente; (2) ingestão de oocistos (forma ambientalmente resistente do parasita, evacuada por gatos, a qual é encontrada em solos); (3) por meio da transmissão vertical, da mãe para o feto (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

3.1.1 Toxoplasmose Ocular

O *T. gondii* é apontado como um dos principais agentes causadores de uveíte posterior em todo o mundo (DARD *et al.*, 2017). Este parasita possui elevada afinidade pelo endotélio microvascular da retina, sendo a retina o principal local de infecção no olho (SMITH *et al.*, 2004). A toxoplasmose ocular é reconhecida como uma inflamação da retina e da coróide

(retinocoroidite). A retinocoroidite toxoplasmática pode ocorrer durante a fase inicial da infecção ou tardiamente após a doença sistêmica, sendo o período de latência muito variável. Normalmente, nos casos de toxoplasmose ocular, pressupõe-se que houve a reativação de infecções latentes congênitas ou adquiridas (PREVIATO *et al.*, 2015). Como resultado do processo infeccioso, lesões cicatrizadas e inativas são formadas, podendo levar a um desaparecimento súbito da visão (MUCCIOLI; BELFORT, 2007; PARK; NAM, 2013).

A infecção sem sintomas raramente é tratada. Entretanto, os fármacos pirimetamina, sulfonamida e leucovorina compõem a combinação comum de fármacos utilizados nas formas graves da doença. Mulheres grávidas normalmente são tratadas com espiramicina. Outras opções são a associação de pirimetamina com clindamicina, cotrimoxazol, azitromicina ou atovaquona. Mas, apesar do tratamento medicamentoso estabelecido, os efeitos colaterais e/ou tóxicos provenientes das combinações de pirimetamina, juntamente com outros macrolídeos como a azitromicina, exige que o tratamento da toxoplasmose ocular seja realizado por um longo período (podendo ir de semanas a meses, até ano) (ANDREWS; FISHER; ADAMS, 2014).

3.1.2 Tratamento da Toxoplasmose

Todos os regimes terapêuticos disponíveis exercem papéis limitados na prevenção da recorrência, pois só atuam contra a fase dos taquizoítos, não exercendo atividade significativa contra os cistos. Portanto, não podem curar as infecções persistentes (ALDAY; DOGGETT, 2017). Os fármacos distribuídos sistemicamente não atingem em quantidades suficientes o interior do olho, devido à baixa penetração intraocular destes fármacos, isto ocorre devido à presença das barreiras hematorretiniana e hematoaquosa (MELLO *et al.*, 2010).

O esquema terapêutico da toxoplasmose preconizado pelo sistema único de saúde (SUS) abrange a administração, por adultos, nos 3 primeiros dias de tratamento, de pirimetamina (75 a 100 mg) e sulfadiazina (500 a 1000 mg), 2 a 4 vezes ao dia, e ácido folínico (5 a 10 mg) por dia, em dose única. Do quarto dia de tratamento em diante, deve-se administrar pirimetamina (25 a 50 mg) e sulfadiazina (500 a 1000 mg), 2 a 4 vezes ao dia, e ácido folínico (5 a 10 mg) por dia, em dose única. Este esquema terapêutico deve perdurar por 4 a 6 semanas. No caso de gestantes, a espiramicina (750 a 1000 mg) deve ser administrada a cada 8 horas; ou a clindamicina, na dose de 600 mg a cada 6 horas. Estes fármacos substituem a pirimetamina no primeiro trimestre de gravidez, devido ao fato de ser teratogênica, e a

sulfadiazina, no terceiro trimestre, pelo risco de desenvolver kernicterus. Utiliza-se também prednisona (40mg/dia), por 1 semana, e 20mg/dia, por outras 7 semanas (BRASIL, 2010).

Este esquema terapêutico recomendado pelo SUS deve ser administrado por via oral, por tempo prolongado, os quais podem levar ao desenvolvimento de efeitos colaterais graves. Além destes efeitos, a pirimetamina e a sulfadiazina também estão correlacionadas a reações graves raras, mas que podem ser fatais, incluindo agranulocitose, Síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica e necrose hepática (ALDAY; DOGGETT, 2017).

Desta forma, diante da existência dos efeitos colaterais e toxicidade do esquema terapêutico primário indicado no tratamento da toxoplasmose ocular (pirimetamina e sulfadiazina), muitos pacientes interrompem o tratamento primário recomendado, e optam por esquemas terapêuticos alternativos (baseados em sufalmetoxazol, trimetoprina, atovaquona ou azitromicina). Entretanto, o uso dessas terapias alternativas é baseado em poucos estudos clínicos, e esses regimes têm taxas semelhantes de intolerância pelo paciente (JACOBSON *et al.*, 2001).

A terapêutica da toxoplasmose ocular também pode ser realizada através da administração de injeções intraoculares de fármacos antibióticos e anti-inflamatórios. Todavia, tais injeções podem levar a um aumento da pressão intraocular, hemorragias e outros, no qual são agressões importantes quando se trata de um olho inflamado e/ou infectado e já acometido (KUNDU *et al.*, 2010).

Em um estudo não comparativo, em um multicêntrico, 20 pacientes com toxoplasmose ocular, com envolvimento do segmento posterior do olho, que foram intolerantes ou contraindicados a terapia por via oral, receberam injeções intravítreas de clindamicina (1,5 mg/0,1 mL) e dexametasona (400 mg/0,1 mL), uma vez por semana, pelo período de quatro semanas, durante a gravidez. Durante os 24 meses de acompanhamento após o tratamento, a toxoplasmose ocular havia sido resolvida em quase todos os casos, sendo que em dois olhos, não houve alteração do quadro. Efeitos adversos sistêmicos ou oculares não foram reportados, permitindo demonstrar a efetividade do tratamento utilizando-se a cavidade vítrea como via alternativa de administração de fármacos para tratar a toxoplasmose ocular (LASAVE *et al.*, 2010; MAENZ *et al.*, 2014).

Todavia, em outro estudo clínico, a redução da lesão ocular após administração de fármacos por via sistêmica foi semelhante àquela observada após a administração por via

intravítrea. Tal fato pôde ser explicada pela maior susceptibilidade do *T. gondii* presente no sangue do que a dos parasitas intraoculares (SOHEILIAN *et al.*, 2011; MAENZ *et al.*, 2014).

Os efeitos colaterais mais significativos são devidos a morte celular em órgãos e tecidos saudáveis. Isto ocorre devido à falta de especificidade de grande parte dos fármacos utilizados atualmente (TANAKA *et al.*, 2009), evidenciando a necessidade de desenvolvimento de pesquisas abrangendo a nanotecnologia, visando o desenvolvimento de formas farmacêuticas não convencionais que diminuam os efeitos adversos alicerçados a uma possível liberação controlada de antiparasitários.

3.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é o ramo da ciência e engenharia encarregados da elaboração e pesquisa de materiais e/ou estruturas utilizados em escala nanométrica. O tamanho dessas partículas possibilita diferentes comunicações com biomoléculas nas superfícies celulares e intracelulares, onde estas podem influenciar em várias propriedades celulares físico-químicas e bioquímicas (HOET; BRÜSKE-HOHLFELD; SALATA, 2004)

O que diferencia um nanomaterial dos demais materiais é o aumento considerável da superfície de contato. Na superfície dessas partículas podem ocorrer reações químicas nas quais uma certa quantidade de material nanoparticulado será mais reativo quando comparado com uma mesma quantidade de material feito com partículas maiores, a biodisponibilidade está diretamente relacionada ao tamanho de partícula do fármaco, quando reduz-se o tamanho das partículas, aumenta-se a biodisponibilidade do fármaco, contribuindo para um aumento da taxa de dissolução, melhorando a solubilidade e biodisponibilidade de ativos farmacológicos insolúveis (PISON *et al.*, 2006).

A nanotecnologia vem sendo foco de interesse de forma crescente, especialmente no que tange a sua aplicação na vetorização de fármacos (PISON *et al.*, 2006). Sendo as nanopartículas constituídas por polímeros um dos principais vetores de fármacos, uma vez que apresentam potencial terapêutico e extensa estabilidade em fluidos biológicos durante o seu armazenamento. São uma das principais linhas de pesquisa biofarmacêutica especialmente no desenvolvimento de sistema de liberação de fármacos em sítios específicos o qual

possibilitou a otimização da velocidade de cedência, regime de dosagem e redução da administração de fármacos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Normalmente, os nanomateriais podem atuar diretamente em um microrganismo ou como carreadores. Neste último papel, fármacos ou moléculas podem ser encaminhados para o órgão alvo (especialmente patógenos intracelulares), aumentando assim a biodisponibilidade e estabilidade do fármaco e/ou molécula, visto que são conhecidas numerosas substâncias com potencial terapêutico, todavia com baixa biodisponibilidade no organismo. Isto ocorre devido a uma melhora no sistema de liberação do mesmo, impedindo uma degradação química e até mesmo enzimática da substância terapêutica de modo a controlar sua liberação, reduzindo os efeitos adversos provenientes do direcionamento da substância ativa até o órgão alvo, evitando assim sua absorção sistêmica (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013).

Os nanocarreadores possibilitam o uso de fármacos potencialmente tóxicos e de baixa solubilidade, da mesma forma que o aumento na duração e eficácia da resposta. Dentre estes sobressaem-se as nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsão, nanopartículas (nanocápsulas e nanoesfera) e os lipossomas, nanopartículas normalmente apresentam diâmetro inferior a 1µm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanopartículas são utilizadas no diagnóstico, tratamento, prevenção e acompanhamento de várias doenças (BAHADORI; MOHAMMADI, 2012). No tratamento da toxoplasmose, as nanopartículas podem atuar como portadores de fármacos, tendo como vantagens modular a farmacocinética, aumentar a eficiência de encapsulação, aumentar a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade e a liberação do alvo à medida que reduz a toxicidade (BAIG *et al.*, 2016; AMEEDUZZAFAR *et al.*, 2018).

3.3 Espiramicina

A espiramicina (ESP) é um antimicrobiano da classe dos macrolídeos, que apresenta ação antiparasitária, e por isso, é usada no tratamento da Toxoplasmose ocular e diversas outras infecções. A espiramicina é produzida pelo actinomiceto *Streptomyces ambofaciens* (CHEW *et al.*, 2012).

A ESP é um pó branco ligeiramente amarelo, de caráter higroscópico, fotossensível quando em solução. Devido ao seu caráter anfifílico, a ESP tem uma baixa solubilidade em

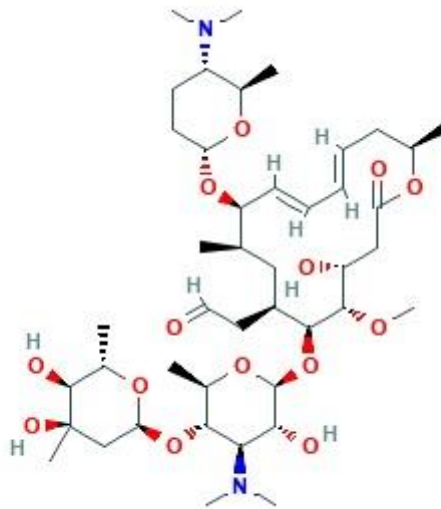
solventes aquosos, mas uma boa solubilidade em solventes orgânicos, como acetona, metanol e etanol (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; EP 6.0).

A espiramicina se mostra eficaz contra a toxoplasmose aguda, sendo esta menos tóxica quando comparada com outros fármacos, como pirimetamina, sulfadiazina e outros (SERRANTI; BUONSENSO; VALENTINI, 2011). Possui uma boa biodisponibilidade por via oral, apresentando uma baixa ligação às proteínas plasmáticas (justificando uma ampla penetração tecidual). Apresenta um tempo de meia-vida de eliminação de aproximadamente 6-8 h. Contudo, mesmo apresentando uma considerada penetração tecidual, a espiramicina corrobora para uma baixa penetração ao longo da BHE (barreira hemato encefálica). Portanto, a espiramicina não atinge concentrações efetivas no cérebro, graças a presença de transportadores de efluxo de proteínas multirresistentes do tipo 2 (Mrp2) e glicoproteínas P, sendo a espiramicina um substrato (SHI *et al.*, 2005; TIAN *et al.*, 2007).

Durante a gravidez, no primeiro trimestre da gestação, quando se confirma a infecção da gestante e ainda não houve infecção fetal, indica-se o tratamento da toxoplasmose com a espiramicina (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Este fármaco não apresenta riscos ao feto, visto que o mesmo também não consegue atravessar a barreira placentária. Entretanto, este fármaco não é eficaz no combate a infecção caso o feto já tenha sido infectado (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Há relatos que altas doses de espiramicina em mulheres grávidas sucederam em altas concentrações instáveis dentro do líquido amniótico, contudo não alcançaram os níveis de concentração desejados para a inibição do crescimento do parasita. Fato este comprovado, quando obteve-se e testou-se o líquido amniótico *in vitro* utilizando culturas de taquizoítos (GRATZL *et al.*, 2002; ROBERT-GANGNEUX *et al.*, 2011).

Figura 2 - Estrutura química da Espiramicina



Fonte: Pubchem. Disponível em <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6419898>2019.> Acesso em 10 de maio 2019

Em gestantes, a espiramicina (750 a 1000 mg) deverá ser administrada a cada 8 horas; ou então a clindamicina, em dose 600 mg a cada 6 horas. No primeiro trimestre da gravidez, estes fármacos substituem a pirimetamina, pois a mesma é teratogênica, já no terceiro trimestre, substitui a sulfadiazina, devido ao risco de desenvolver kernicterus. Tem-se a opção de utilizar a prednisona (40mg/dia), por uma semana e 20 mg/dia, por 7 semanas (BRASIL, 2010).

Na toxoplasmose congênita, a espiramicina é usada isoladamente ou, dependendo da fase gestacional, combinada com sulfadiazina e pirimetamina. A última combinação de tratamentos produz efeitos tóxicos, incluindo a supressão da medula óssea, que pode ser atenuada pelo uso adjuvante de ácido folínico (ANTCZAK; DZITKO; DŁUGOŃSKA, 2016).

A espiramicina também atua como agente anti-inflamatório, modulando negativamente a produção de citonas pró-inflamatórias. A espiramicina proporciona um aumento da expressão de interleucinas (IL-4 e IL-10), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon ($\text{INF--}\alpha$). (FRANCO *et al.*, 2011).

Macrolídeos, além de serem eficazes contra as infecções bacterianas, também apresentam efetividade sobre no combate à infecções por parasitas intracelulares, como *Toxoplasma gondii* e *Leishmania spp* (COSTA *et al.*, 2009)

Além do mais, a espiramicina simultaneamente com outros fármacos da classe dos macrolídeos, inibe a quimiotaxia e a infiltração de neutrófilos para o centro da inflamação. Ela também atua inibindo a formação de várias outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , possivelmente pelo mecanismo de supressão da transcrição do fator nuclear Kappa-B ou do ativador da proteína-1. Por fim, a espiramicina também inibe a geração do leucotrieno B₄, que atrai neutrófilos para o foco inflamatório, inibindo a liberação de ânions superóxidos por estas células (BRYDAK-GODOWSKA *et al.*, 2015).

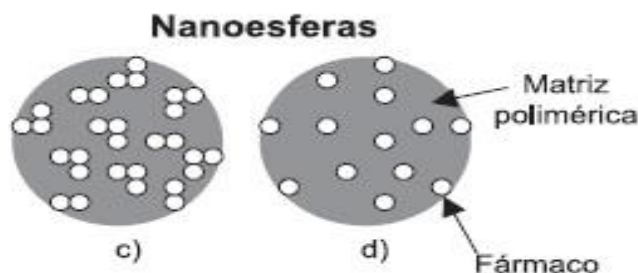
O desenvolvimento de formulações de espiramicina em nanocarreadores para administração ocular para o tratamento da toxoplasmose ocular apresenta vantagens visto que tais formulações contornam problemas relacionados a biodisponibilidade do fármaco, contribuem para sua menor degradação, reduz consideravelmente a sua toxicidade. Sendo assim adotou-se, como estratégia, no presente estudo, a elaboração de nanopartículas constituídas de espiramicina e PCL como alternativa terapêutica que permitiria ultrapassar as limitações biofarmacêuticas da espiramicina e possibilitaria o tratamento localizado da toxoplasmose ocular.

3.4 Nanoesferas

Nanopartículas são partículas coloidais de grandeza na ordem de nanômetros (10^{-9} m), compreendendo uma faixa de 10-1000 nm de diâmetro (FERREIRA; RANGEL, 2009).

As nanopartículas podem ser agrupadas em duas classes principais, nanocápsulas e nanoesferas. As nanopartículas são constituídas de diferentes materiais, englobando metais, lipídios e polímeros – diferenciando-se entre si de acordo com a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são estruturas de reserva, ou seja, são compostas por uma única membrana polimérica existente ao redor de um núcleo ocupado por um óleo ou emulsão, e o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as nanoesferas (Figura 3) não apresentam em sua composição óleo, sendo, portanto, formadas unicamente pela matriz polimérica, espaço onde o fármaco poderá estar adsorvido ou retido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Figura 3 - Representação esquemática de nanoesfera. a) Fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas. b) Fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003.

Em terapias oculares, um dos grandes desafios é de que a concentração administrada localmente do fármaco seja mantida. Geralmente, nas formulações oftálmicas farmacêuticas convencionais, menos de 5% do fármaco aplicado é capaz de atravessar a córnea e chegar aos tecidos intraoculares. Com isto, é necessário aumentar-se a quantidade de administrações com o intuito de alcançar a eficácia terapêutica, que normalmente está associada a efeitos adversos (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997).

Em estudos anteriores, sistemas de liberação controlada foram apontadas com possível potencial para aplicação de fármacos oculares. Lipossomas e nanopartículas poliméricas (nanocápsula e nanoesfera) estão entre as abordagens mais bem sucedidas para sistemas de liberação ocular. Diversos estudos evidenciaram a eficácia de fármacos encapsulados com polímeros biodegradáveis para tratamentos oculares. Devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, mostrando uma entrega eficaz do fármaco em diferentes tecidos do olho (ARAÚJO *et al.*, 2009; PARRA *et al.*, 2015; YACASI *et al.*, 2016).

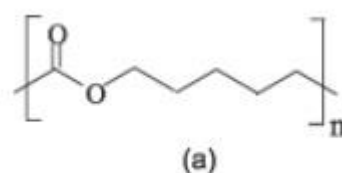
Os fármacos são encapsuladas em polímeros sintéticos e naturais a fim de permitir a liberação local prolongada e o direcionamento de tecidos para os fármacos (SAKURAI *et al.*, 2001).

3.4.1 Polímero PCL

O polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um polímero sintético, fabricado a partir da abertura do anel da ϵ -caprolactona (Figura 4) subseguido por uma polimerização. É um polímero hidrofóbico, semicristalino, com pequeno ponto de fusão (59-64°C), e temperatura de transição de fase de aproximadamente 60° C (CHANG *et al.*, 1986). O PCL é um polímero

de peso molecular variável na faixa de 5000 e 80000. Sua degradação em organismo humano é lenta quando comparado a outros polímeros devido à falta de enzimas apropriadas, o qual não significa que este polímero não seja biodegradável (VERT, 2009). O PCL é degradado em dois estágios: primeiramente ocorre, uma degradação hidrolítica não enzimática das ligações éster e posteriormente, quando a PCL já apresenta uma diminuição da massa molar, ocorre uma degradação intracelular (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Figura 4–Estrutura química da Policaprolactona



Fonte: Scielo. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400031 > Acesso em 17 de maio 2019

3.4.2 Tensoativo - Tween 80

Agentes emulsificantes ou surfactantes são dispostos molecularmente por uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar) que agem na redução da tensão interfacial (SILVA *et al.*, 2015).

A porção apolar constituída por cadeias hidrocarbônicas, pode ser encontrada sob forma linear ramificada ou partes cíclicas a qual interage muito pouco com moléculas de água, sendo esta intitulada como porção hidrofóbica, já a porção hidrofílica ou iônica interage vigorosamente com a água devido a interações dipolo-dipolo ou íon-dipolo, sendo denominada portanto como porção hidrofílica da molécula (MORAIS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2015).

3.4.2.1 Classificação dos tensoativos

Os tensoativos podem ser classificados em quatro tipos principais: aniônico, catiônico, não-iônico e anfótero.

- Aniônico

Tensoativo aniônico exibem carga elétrica na região hidrofílica que ao se dissociar em água formam íons carregados negativamente. Constituindo a maior classe de tensoativos, são os mais estudados de modo geral, nesta classe encontram-se os sabões. Normalmente, não são compatíveis com os tensoativos catiônicos devido ao risco de se neutralizarem, tendendo a formação de um composto neutro insolúvel em água a qual precipita na solução. Geralmente são sensíveis à água dura, devido esta exibir alto teor de sais de cálcio e magnésio podendo o mesmo neutralizar e precipitar o tensoativo. As características físico-químicas dos tensoativos aniônicos são demasiadamente influenciados por presença de eletrólitos em solução, como sais solubilizados ou extremos de pH na solução (DALTIM, 2011; SILVA *et al.*, 2015)

- Catiônico

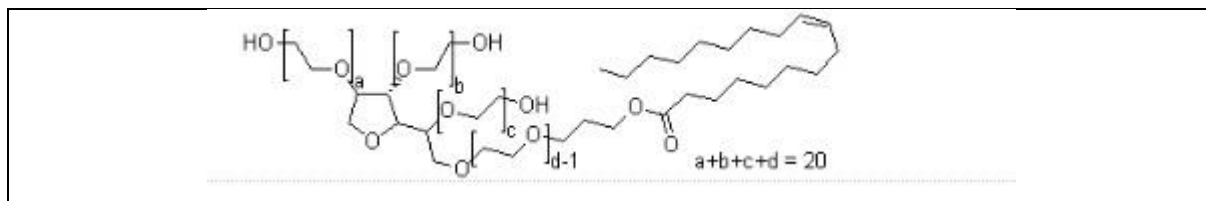
Exibem carga elétrica na porção hidrofílica formando íons carregados positivamente quando estes estão dissociados em meio aquoso. Representam por uma classe com poucos tensoativos, sendo estes os derivados de amônio quaternário e aminas de cadeia longa. Geralmente, apresentam elevada toxicidade aquáticas quando comparado com outras classes de tensoativos. Suas características físico químicas são vigorosamente influenciadas por presença de eletrólitos em solução (ROSSI *et al.*, 2006; DALTIM, 2011; SILVA *et al.*, 2015).

- Não-iônicos

Estes tensoativos não formam íons em solução aquosa, a sua solubilidade em água é devido à presença de grupos funcionais que tem afinidade pela água. É a classe de tensoativo mais utilizada no mercado, sendo largamente utilizado em emulsões cosméticas graças as suas características, como a compatibilidade com pH cutâneo e boa estabilidade em diferentes faixas de pH. Geralmente são compatíveis com todas as outras classes de tensoativos. Devido as suas propriedades físico químicas, estes não são influenciados pela presença de eletrólitos (DALTIM, 2011). Os tensoativos desta classe que são mais utilizados são os ésteres de sorbitano, conhecidos como Spans, agentes emulsionantes A/O e os polissorbatos, Tween, derivados de poliacetilênicos dos spans, agentes emulsionantes O/A (ATTWOOD; FLORENCE; ROTHCHILD, 2003; SILVA *et al.*, 2015).

O tween é composto por ésteres de sorbitano etoxilados (Figura 5). Devido a sua característica hidrofílica, normalmente são solúveis em água e são empregados para obtenção de emulsões d tipo óleo em água O/A. Apresenta baixo potencial de toxicidade (NETO, 2009).

Figura 5–Estrutura química do Tween 80



Fonte: LookChem Disponível em < <https://www.lookchem.com/Tween-80/> > Acesso em 05 de jun.

2019

O Tween 80 é um tensoativo hidrossolúvel do tipo não iônico que apresenta a vantagem de manter a dispersão estável em casos de mudanças de pH e alterações de concentração de eletrólitos no meio (TAMJIDI et al., 2013). Este polissorbato foi utilizado em alguns estudos empregando revestimento de nanopartículas por apresentar um caráter anfifílico, o qual diminui a tensão superficial, promovendo aumento do contato entre partícula e célula. O Tween 80 também é muito utilizado com a finalidade de manter a estabilidade e prevenir a agregação das partículas (KREUTER,1997; VENTURINI *et al.*, 2011; LOBATO *et al.*, 2013).

- Anfóteros

São constituídos tanto da carga positiva quanto negativa. Consequentemente, conforme o pH da solução podem apresentar caráter aniônico (pH entre 9 e 10) ou catiônico (pH de 4 a 9). Portanto, pode-se afirmar que são compostos que exibem os grupos ácido e base. Devido ao seu custo oneroso, compõem a classe de tensoativos menos utilizada no mercado e, normalmente, são compatíveis com todas as demais classes de tensoativos (DALTIM, 2011; ROSSI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2015).

4. MATERIAIS

4.1. Substâncias químicas e polímero

- Espiramicina (Sigma-Aldrich, EUA)
- Poli(ε-caprolactona) - PCL (AldrichChemistry®)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA)

4.1.2. Reagentes e vidrarias

- Água ultrapura purificada em sistema Milli-Q®;
- Balões, buretas e pipetas volumétricas calibradas;
- Béqueres;
- Acetona;

4.1.3. Equipamentos

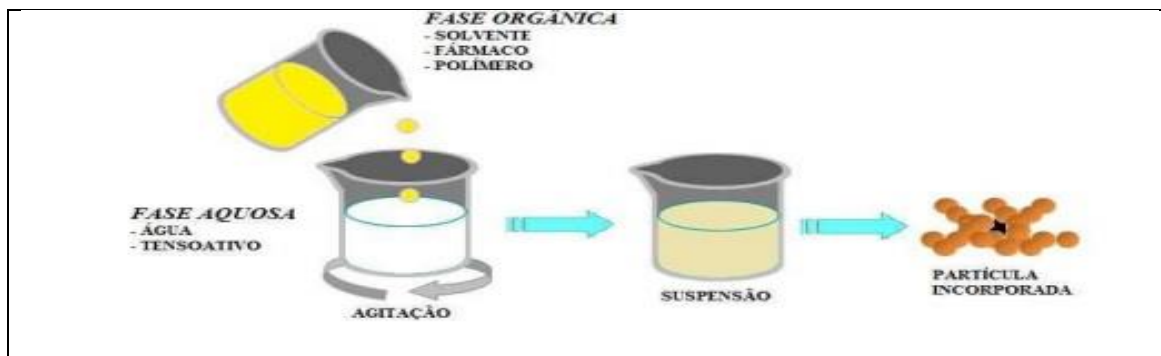
- Balança analítica Shimadzu®, modelo AUW220D;
- Espectrofotômetro UV/Vis - 200 a 1000nm, modelo UV-M51;
- Micropipetas automáticas;
- Vórtex
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®).

5. METODOLOGIA

5.1 Preparo das nanopartículas poliméricas – formulação piloto

As nanopartículas foram produzidas pelo método de nanoprecipitação, também conhecido por deposição interfacial do polímero pré-formado acompanhado por evaporação do solvente, conforme descrito por Fessi *et al.*, 1989. Preparou-se uma solução (fase orgânica) por meio da solubilização de 50 mg de PCL e 2 mg de espiramicina em 8 mL de acetona. Esta solução foi transferida, por gotejamento com auxílio de pipeta de Pasteur, para uma fase aquosa contendo 5 mL de solução de Tween 80 a 1%(v/v) e 6 mL de água purificada, totalizando 11 mL de solução aquosa (Figura 6). A nanoemulsão (formulação piloto) formada permaneceu a temperatura ambiente (25-30° C), sob agitação magnética, durante 8 horas, para evaporação da acetona.

Figura 6. Representação esquemática do método de nanoprecipitação.



Fonte:SBQ. Disponível em < <http://www.s bq.org.br/38ra/cdrom/resumos/T1530-1.pdf>> Acesso em 15 de maio 2019

5.2. Planejamento experimental para o desenvolvimento de nanopartículas utilizando delineamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central

Para o delineamento fatorial, as nanopartículas foram preparadas conforme descrito no item anterior. A partir da formulação piloto, foram desenvolvidas 9 formulações por meio da variação de 3 fatores independentes (massa de espiramicina, massa da PCL e concentração do Tween 80). Cada uma destas variáveis foi modificada em dois níveis [nível alto (+1) e nível baixo (-1)], em relação ao ponto central (0), que por sua vez, foi definido no momento da elaboração da formulação piloto (Tabela 1).

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes alteradas para a realização do delineamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central.

Variável independente	Nível baixo (-1)	Ponto central (0)	Nível alto (+1)
Massa de espiramicina	1 mg	2 mg	3 mg
Concentração do Tween 80	0,5% (m/v)	1% (m/v)	1,5% (m/v)
Massa da PCL	25 mg	50 mg	75 mg

A Tabela 2 representa a matriz do delineamento fatorial, no qual foram preparadas 9 formulações de nanopartículas. Estas formulações foram numeradas de 1 a 9. A formulação 9 representa a formulação piloto, cujas variáveis independentes não foram alteradas [ponto central – (0)]. Adicionalmente, a formulação 9 foi preparada em quintuplicatas, e as demais formulações (1 a 8) foram preparadas em triplicata.

Tabela 2 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central aplicado ao desenvolvimento das nanopartículas à base de espiramicina e PCL, classificadas como formulações 1 a 9, em que as variáveis independentes massa de espiramicina; concentração do tensoativo Tween80 e concentração do polímero PCL foram modificados deliberadamente

Formulações	Massa de espiramicina	Concentração do surfactante (% m/v)	Massa do polímero (mg)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0

5.3 Determinação do diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (IP) das nanopartículas das 9 formulações do delineamento fatorial foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica. Para a determinação destes parâmetros, 2 μ L de cada formulação foram diluídos em 1 mL de água ultrapurificada. O resultado foi obtido através da utilização do equipamento PN3702 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), através do espalhamento dinâmico da luz (EDL), com um ângulo de detecção 173° em relação à incidência do laser a 25°C. Para que as nanoformulações fossem classificadas monodispersas o valor máximo aceitável definido para o IP foi de 0.3 (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O Potencial zeta (ζ) foi estabelecido por anemometria de laser doppler associado à microeletroforese (Zetasizer PN3702/Malvern Instruments, Malvern, UK). Para a determinação deste parâmetro, 2 μ L de cada formulação foram diluídos em 1 mL de água

ultrapurificada. Estas nanopartículas foram analisadas em ângulo de detecção de 173° em relação à incidência do laser, a 25°C.

5.4 Avaliação estatística por ANOVA das formulações obtidas no delineamento fatorial

O diâmetro médio, IP e potencial zeta obtidos para as nanopartículas das 9 formulações foram comparados por análise da variância (ANOVA), seguido de pós teste Tukey, para comparação múltipla entre grupos. Utilizou-se o programa Prisma® versão 6.0. Admitiu-se intervalo de confiança de 95%, sendo os valores de $p < 0,05$ reconhecidos como estatisticamente significativos.

5.5 Porcentagem e eficiência de encapsulação

Baseado nos resultados do delineamento fatorial, todos os lotes das nanopartículas preparadas foram analisados. A ESP foi quantificada com a finalidade de se determinar a eficiência de encapsulação (EE) deste fármaco nas nanopartículas. As nanoformulações foram homogeneizadas com o auxílio de um vórtex, posteriormente o fármaco não encapsulado foi removido utilizando centrifugação a 14.000 g por 30 minutos, a 8° C. Assim sendo, 800 µL de sobrenadante de cada lote preparado foi adicionado a 3200 µL de solvente acetona (1:5). Posteriormente todas estas soluções foram analisadas por espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 230 nm e a EE foi determinada através da diferença do percentual entre a quantidade de ESP não encapsulada e aquela adicionada na síntese conforme equação abaixo.

O cálculo para a obtenção da porcentagem de encapsulação foi realizado de acordo com o indicado na Equação 1.

$$\% \text{ encapsulação} = \frac{\text{Espiramicina total na suspensão (mg)} - \text{Espiramicina centrifugada (mg)}}{\text{Espiramicina total na suspensão (mg)}} \times 100$$

Equação 1

A eficiência de encapsulação das nanopartículas foi calculada pela quantidade de Espiramicina encapsulado dividido pela quantidade de Espiramicina pesado e adicionado ao preparo da suspensão das nanopartículas x 100. O cálculo foi realizado conforme expresso na Equação 2.

$\text{Eficiência de Encapsulação \%} = \frac{\text{Quantidade total de Espiramicina encapsulado (mg)} \times 100}{\text{Quantidade de Espiramicina pesado colocado na NP (mL)}}$

Equação 2

5.5.1 Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria UV/Vis para quantificação de ESP nas nanopartículas

5.5.1.1 Preparo de soluções utilizadas no desenvolvimento do método analítico

Para o preparo das soluções estoques de ESP, PCL e Tween 80 foi empregado como solvente e diluente a acetona na proporção 1:1.

Solução estoque de ESP (105µg/mL): pesou-se exatamente cerca de 0,525 mg de ESP foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL. O fármaco foi solubilizado e o volume do balão ajustado utilizando acetona.

Solução estoque de PCL (3947µg/mL): pesou-se exatamente cerca de 19,735 mg de ERL foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL. O polímero foi solubilizado e o volume do balão ajustado utilizando acetona.

Solução estoque de Tween 80 (15µg/mL): pesou-se exatamente cerca de 75 mg de Tween 80 foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL. O tensoativo foi solubilizado e o volume do balão ajustado utilizando acetona.

O branco foi preparado a partir das soluções estoque de PCL e tween, na proporção 1:1 em um balão volumétrico de 5,0 mL o qual o volume foi ajustado utilizando acetona, o branco era constituído de todos os componentes da formulação menos o fármaco afim de se eliminar possíveis interferências.

Com o propósito de se traçar os espectros na região do UV/Vis (200 a 450 nm) e verificar a seletividade do método, foram realizadas varreduras espectrais do fármaco e dos diferentes componentes da nanopartícula isoladamente, com o propósito de avaliar uma possível interferência dos componentes na quantificação do analito. A partir da análise dos resultados obtidos determinou-se o comprimento de onda que será utilizado para a quantificação do fármaco incorporado nas nanopartículas. O qual o comprimento de máxima absorção foi o de 230 nm.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento das nanopartículas de espiramicina constituídas do polímero PCL

As nanopartículas desenvolvidas fundamentam-se em sistemas monolíticos produzidos por polímero PCL e o fármaco ESP. Estas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, que é baseado na emulsificação espontânea de uma fase interna dita orgânica, contendo o polímero que é dissolvido em uma fase externa aquosa. Na nanoprecipitação, na fase orgânica os polímeros mais utilizados são derivados do ácido lático (PLA), do ácido glicólico (PGA), polietilenoglicol (PEG), e derivados da caprolactona (PCL), no qual o fármaco é dissolvido em um solvente de intermediária polaridade e miscível com água, como a acetona e/ou etanol. Esta fase então é gotejada ou vertida para uma solução aquosa contendo estabilizador, tensoativo, sob constante agitação. A agitação desta emulsão é a etapa determinante para a formação de nanoesferas, a qual deverá ser feita antes da precipitação do polímero, a fim de obter gotículas de fase interna de dimensões coloidais. A deposição do polímero na interface entre a água e o solvente orgânico, provocada por uma ligeira difusão do solvente, levando à formação instantânea de uma suspensão coloidal. Finalmente, remove-se o solvente orgânico, a fim de favorecer a ocorrência da precipitação do polímero na fase externa aquosa, resultando na formação das nanoesferas (FESSI *et al.*, 1989; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

De modo que a técnica executada apresenta algumas vantagens, como a simplicidade, boa reprodutibilidade, além do mais, não necessita de sistemas de homogeneização de alta energia nem altas quantidades de solventes tóxicos e tensoativos (MILADI *et al.*, 2016).

Primeiramente, desenvolveu-se e caracterizou-se uma formulação piloto, conforme descrito no item 5.1 deste trabalho, denominada como formulação piloto, a etapa de caracterização compreende as análises quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Após os resultados desta análise foram feitas as demais formulações, através do delineamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central por meio da variação de 3 fatores independentes (massa de espiramicina, massa da PCL e concentração do Tween 80).

Com o intuito de melhorar as propriedades farmacocinéticas da espiramicina através do aperfeiçoamento de uma formulação e/ou tecnologia de administração, foram

desenvolvidas nanopartículas destinadas ao tratamento da toxoplasmose ocular, uma infecção ocular que pode ser fatal para o olho. Para o seu desenvolvimento, selecionou-se Tween-80, um tensoativo pertencente a classe de surfactantes não-iônico, vastamente utilizada em formulações farmacêuticas oftálmicas. Nestas formulações o Tween-80 contribui para um aumento da solubilidade de fármacos, através da formação de micelas. Além do mais o Tween-80 é constituído de uma cadeia de ácido oleico com 18 carbonos e uma ligação insaturada. É sabido que tensoativos com essas características estruturais, contribuem para a obtenção de emulsões mais estáveis, além de que a presença de instaurações em cadeias de tensoativos não-iônicos pode estar relacionada com a formação de emulsões com partículas menores (AMMAR *et al.*, 2009; SCHMIDTS *et al.*; MELO-ESPINOSA *et al.*, 2016; NEJADMANSOURI *et al.*, 2016;2009; DAMICO *et al.*, 2017).

Já o polímero selecionado foi o PCL, é um poliéster hidrofóbico biorreabsorvível aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) amplamente utilizado no preparo de formulações de nanopartículas poliméricas e nos sistemas de liberação prolongado para fármacos solúveis em água, normalmente é reconhecido por exibir uma baixa taxa de bioerosão, esta taxa pode ser resultante da sua alta hidrofobicidade, bem como seu alto peso molecular (WANG *et al.*, 2006; RAMESH, 2009). Por ser um material altamente biocompatível, biodegradável e é facilmente fabricado por técnicas convencionais de processamento de polímeros, sendo o PCL o transportador de polímero mais frequentemente utilizado (DAVOODI; SRINIVASAN; WANG, 2016). No campo oftálmico, o PCL foi investigado como um suporte nanofibroso para reconstrução de superfície ocular e também como sistema nanocarreador para liberação de fármacos oculares (SHARMA *et al.*, 2014). Sendo portanto um material apropriado para a preparação de nanopartículas para liberação intraocular de fármacos oftálmicos.

A utilização do método de nanoprecipitação mostrou-se eficaz no preparo de formulações de nanoesferas de poli-e-caprolactona contendo o fármaco espiramicina, validando uma técnica com potencial de obtenção de sistemas mais seguros e eficazes para o tratamento da toxoplasmose ocular. De tal modo que, as nanopartículas desenvolvidas quando administradas diretamente no foco da infecção, possibilitarão a ação terapêutica local, estimulando o progresso do quadro infeccioso, e presumivelmente minimizando e eliminando os efeitos colaterais ou possíveis reações adversas sistêmicas provenientes do seu uso convencional, e conseqüentemente a uma melhor adesão ao tratamento.

6.2 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas após o delineamento fatorial 2³

O delineamento fatorial 2³ com réplicas no ponto central foi empregado, com o intuito de se determinar a influência da modificação dos componentes presentes no desenvolvimento das nanopartículas. Para estabelecer uma formulação otimizada, nove formulações foram desenvolvidas por meio da variação de três parâmetros independentes, como: massa de espiramicina, massa do polímero e concentração do tensoativo. Para obtenção do diâmetro, I.P. e potencial zeta, as nanopartículas foram redispersas em veículo aquoso a qual foram submetidas à caracterização. Os resultados dos parâmetros avaliados depois da caracterização das nanopartículas são explanados na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta obtidos para as nanopartículas das formulações 1 a 9 realizando-se o delineamento fatorial.

Formulação	Níveis			Resultados		
	Massa	Conc.	Massa	Diâmetro médio (nm)	I.P.	Potencial zeta (mV)
	ESP (mg)	Tween 80 (%)	PCL (mg)			
1	-1	-1	-1	149,6± 2,72	0,105± 0,015	-28,23 ± 1,00
2	1	-1	-1	145,8± 4,23	0,111± 0,003	- 25,20± 1,61
3	-1	1	-1	164,5± 1,66	0,094± 0,008	- 26,13± 1,80
4	1	1	-1	174,5± 37,04	0,124± 0,026	-25,63± 3,30
5	-1	-1	1	195,7± 9,76	0,125± 0,016	-29,30± 2,95
6	1	-1	1	193,0± 3,74	0,124± 0,001	- 27,40± 1,63
7	-1	1	1	214,1± 4,80	0,135± 0,015	- 27,40± 3,72
8	1	1	1	210,4± 24,90	0,148± 0,024	- 21,13± 4,20
9*	0	0	0	177,7± 10,01	0,111± 0,251	- 25,14± 2,01

*Valores representados como média (n=5).

Desenvolver nanopartículas como veículos de distribuição de fármacos é essencial para atingir a máxima captação celular e biodisponibilidade terapêutica, isto é, evitar uma biodistribuição descontrolada, uma rápida depuração e toxicidade sistêmica em tecidos saudáveis. Entretanto, sua efetividade está relacionada com a uniformidade do tamanho de partículas e potencial zeta. Portanto, mudanças nessas propriedades poderá afetar diretamente

propriedades com severas implicações biológicas significativas na internalização celular, cinética e biodistribuição (SADAT *et al.*, 2016).

A técnica empregada para a determinação do tamanho médio dos nanocarreadores e o índice de polidispersão (IP) das suspensões de nanoesferas é baseada na mudança de luz espalhada pelas nanoesferas. Estas variações no tempo de intensidade de luz espalhada podem ser explicadas pelo coeficiente de difusão de nanopartículas e consequentemente ao seu diâmetro hidrodinâmico. Para se determinar a intensidade de luz espalhada é capturada por um detector de autocorrelação e posteriormente o cálculo de tamanho médio e IP (SOUZA *et al.*, 2012).

Segundo Gupta e Kompella (2006), para que o transporte das nanopartículas constituída pelo agente terapêutico seja efetivo e não cause danos ao tecido, é sugerido que esta estrutura não exceda 300 nm de diâmetro. Verificaram-se que os tamanhos médios das nanopartículas das formulações desenvolvidas variaram entre $145,8 \pm 4,23$ nm a $214,1 \pm 4,80$ nm, apontando segundo os autores mencionados que todos os lotes produzidos apresentaram um tamanho médio apropriado para possíveis aplicações oculares.

O tamanho das nanoesferas é estabelecido pela concentração do polímero na fase interna da emulsão. Para um determinado volume da fase interna, o aumento da concentração do polímero contribui para um aumento da viscosidade dessa fase, obtendo-se nanoesferas de maiores dimensões, devido à maior dificuldade de dispersão da fase interna na fase externa (ARAÚJO *et al.*, 2009).

O aumento do tamanho das partículas com o aumento da concentração do polímero é bem descrito na literatura. O aumento do tamanho das partículas em função da concentração de polímero pode ser exemplificado de duas formas: com o aumento da concentração do polímero, há um maior quantidade de cadeias poliméricas se agregando e mais cadeias poliméricas permanecem associadas durante o processo de difusão, levando assim à formação de partículas maiores e, o aumento da concentração de polímero aumenta a viscosidade da fase orgânica, proporcionando assim uma maior resistência à transferência de massa, de modo que a difusão do polímero da fase orgânica para a fase aquosa é reduzida, e são formadas nanopartículas maiores. (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). O qual corrobora os resultados encontrados nos lotes das formulações 5,6,7 e 8, formulações estas que foram

produzidas com as maiores concentração do polímero PCL e consequentemente apresentaram os maiores tamanhos dentre as formulações.

Quanto ao índice de polidispersão, este refere-se a homogeneidade no tamanho das partículas altos valores indicam heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão; valores superiores a 0,3 refletem uma ampla variação no diâmetro das nanopartículas. Índices de polidispersão inferiores a 0,2 sugerem que a distribuição do diâmetro das partículas se encontra em uma estreita faixa de diâmetros (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Em relação as nanopartículas, todas as formulações foram monodispersas, pois estas apresentaram valores inferiores a 0,3, podendo ser consideradas sistemas adequados à administração parenteral e intraocular.

Diversos fatores físico-químicos e/ou farmacotécnicos podem ser citados como capazes de interferir na variação de tamanho e das nanopartículas e no índice de polidispersão. Dentre eles: método de preparo das nanopartículas concentração no polímero e/ou fármaco, a presença do fármaco no meio reacional que influencia o processo de nucleação, levando a partículas maiores com ampla distribuição de tamanho, proporção entre fase interna/externa (aquosa-orgânica), além do tempo de vazão entre as fases orgânica sob a fase aquosa (MILADI *et al.*, 2016; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Já o potencial zeta representa a carga presente na superfície das nanopartículas. Este parâmetro pode estar relacionado com a composição da partícula e o dispersante do meio (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A determinação do potencial zeta das nanopartículas, é baseado na técnica que mede a velocidade de mobilidade das partículas que estão sob influência de um campo elétrico. Este movimento das nanopartículas são guiados pela direção de um eletrodo de carga elétrica oposta e a velocidade com que essa movimentação ocorre é equivalente a dimensão do seu potencial zeta (FORMARIZ *et al.*, 2006; MORAES, 2009).

O potencial zeta é um significativo indicador de estabilidade coloidal, visto que o mesmo representa o potencial de superfície de partículas, ao qual é intimamente influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante, em consequência da dissociação de grupos funcionais existentes na superfície da partícula ou devido a adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. Os valores do potencial zeta são expressos pela natureza química do polímero utilizado e demais componentes da formulação que

contribuem para uma modificação da superfície das partículas. O potencial zeta é uma especificação utilizada para a avaliação da estabilidade, a obtenção de valores ± 30 mV asseguram uma estabilidade a longo prazo, visto que forças repulsivas podem evitar agregação de partículas, isto pode ocorrer devido as colisões das nanopartículas que ocorrem devido a repulsão entre as cargas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Geralmente, quando se tem partículas com valores de potencial zeta, em módulo, igual a 10 mV, estas são classificadas como neutras, ao passo que partículas com valores próximos ou superior a 30 mV, em modulo, são ditas aniônicas ou catiônicas, dependentes da carga presente em sua superfície (McNEIL,2011).

Os potenciais zeta das nanopartículas desenvolvidas podem ser analisados na Tabela 3. O polímero PCL, pode ter influenciado positivamente sobre o potencial zeta, visto que entre as formulações com maiores quantidades de PCL estas apresentaram valores maiores (menos negativos), evidenciando uma menor estabilidade para formulações em que foi utilizado nível máximo de polímero, uma vez que haverá menor repulsão entre as nanopartículas, e maior probabilidade de agregação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).A carga negativa das suspensões pode ter sido proveniente, em parte, pela dissociação dos grupos carboxílicos terminais da PCL localizados na superfície das partículas(CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997).

Por meio da modificação das variáveis independentes mediante o delineamento fatorial, objetiva-se a determinação de uma potencial formulação, a qual foi avaliada através da caracterização das nanopartículas. Realizou-se uma análise de variância a fim de se determinar a influência de cada variável sobre o tamanho, IP e potencial zeta. Quando há interação entre os fatores e ambas as variáveis são utilizadas no nível mais alto (+1), obtém-se partículas com menor potencial zeta. O lote de formulação número 8, o qual todas as variáveis empregadas foram de nível mais alta, sendo esta a que apresentou menor valor de potencial zeta -21,13 mV.

Diante dos resultados obtidos, definiu-se que a formulação 3 apresentou-se como satisfatória diante das modificações deliberadas nos parâmetros do delineamento, em virtude dos resultados apresentados, diâmetro próximo a 164 nm, I.P. próximo a 0,094, evidenciando a existência de um sistema monodisperso adequado a uma administração intraocular. Quanto

ao potencial zeta desta formulação, esta possui valor próximo a -26mV evidenciando a uma estabilidade do sistema.

6.3 Porcentagem e eficiência de encapsulação da Espiramicina

A determinação da eficiência de encapsulação da espiramicina às nanopartículas exibe considerável complexidade devido ao tamanho reduzido destas, o que impacta significativamente na separação da porção de fármaco livre da porção associada. Vários fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco incorporado nestes sistemas nanoestruturados, como as características físico químicas do fármaco, o pH do meio, a quantidade de fármaco adicionado na formulação, as características da superfície da partícula, e o tensoativo utilizado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Para se avaliar a capacidade de encapsulação da ESP pelas nanopartículas, realizou-se o teste de eficiência de encapsulação (EE) utilizando-se o método espectrofotométrico UV/Vis. Na Tabela 4 estão apresentadas as EE da ESP nas nove formulações desenvolvidas. Todas as formulações apresentaram EE superiores a 70%.

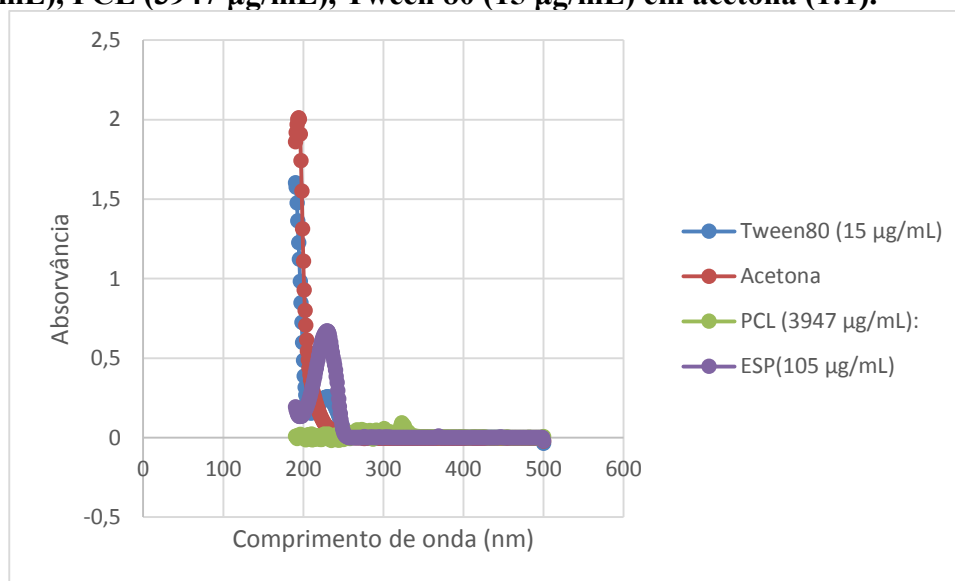
Tabela 4 - EE da ESP nas 9 formulações de nanopartículas obtidas a partir da modificação das seguintes variáveis independentes: massa da ESP, massa do polímero PCL e concentração de Tween 80

Formulação	Níveis			Resultados
	Massa	Conc.	Massa	EE (%)
	ESP (mg)	Tween 80 (%)	PCL (mg)	
1	-1	-1	-1	70,80
2	1	-1	-1	80,89
3	-1	1	-1	83,76
4	1	1	-1	82,86
5	-1	-1	1	71,13
6	1	-1	1	71,56
7	-1	1	1	70,65
8	1	1	1	71,84
9*	0	0	0	84,75

* Valores apresentados como média + DP (n=5).

O método analítico empregado para a quantificação de ESP foi espectrometria UV/Vis, o espectro com os resultados obtidos durante a varredura encontram-se na Figura 7, o qual devido à falta de tempo hábil obtiveram-se resultados preliminares que futuramente servirão para uma validação do método.

Figura 7 - Espectros de absorção na região do UV/Vis (200 a 450 nm) de soluções ESP (105µg/mL), PCL (3947 µg/mL), Tween 80 (15 µg/mL) em acetona (1:1).



Abreviaturas: ESP (espiramicina); PCL (policaprolactona).

Diversos estudos relatam sobre alguns fatores limitantes em relação ao tratamento da toxoplasmose ocular, principalmente na falta da erradicação completa do parasita, resultando em recidivas da doença. A busca por novas alternativas terapêuticas que atuem diretamente sobre o foco da inflamação vem sendo foco de estudos. Os resultados apresentados durante este estudo, são sugestivos de que o sistema desenvolvido contribui para uma potencial estratégia no redirecionamento de fármaco para o tratamento da toxoplasmose ocular, sendo esta uma alternativa para retroceder as limitações da terapêutica convencional.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho para o desenvolvimento de nanopartículas utilizou-se o planejamento fatorial 2^3 pode ser considerado um delineamento importante para ponderar a influência dos fatores que permitem a caracterização de nanoesferas, tais como, polidispersão, potencial zeta, tamanho e eficiência de encapsulamento. Nota-se a importância da avaliação destes parâmetros nas formulações, a fim de verificar a estabilidade das mesmas.

Após a obtenção das formulações de nanopartículas por meio do delineamento fatorial, realizou-se o estudo da eficiência de encapsulação da espiramicina nestes sistemas. A formulação 9 mostrou maior eficiência de encapsulação (84,75%) quando comparada às outras. A formulação 3 apresentou eficiência de encapsulação de 83,76%, sendo este o segundo maior valor de encapsulação obtido. Considerando o fato de que a formulação 3 é a otimizada, e diante da alta porcentagem de encapsulação da espiramicina nesta formulação, estas nanopartículas devem ser selecionadas para experimentos futuros.

Após a caracterização das nanopartículas, a formulação 3 apresentou resultados otimizados com diâmetro de 164,47 nm, IP de 0,094, potencial zeta de -26,13mV e EE de aproximadamente 84% de ESP. Portanto as formulações apresentaram-se monodispersas, já os valores obtidos de potencial zeta são sugestivos de um sistema coloidal estável. Em relação a incorporação da ESP na formulação proposta, apresentou valores entre 70% e 84%, sendo portanto indicador de escolha apropriada do nanocarreador desenvolvido. Os resultados encontrados da eficiência de encapsulação durante o presente estudo sugeriu que a metodologia aplicada foi apropriada, já que não houve perdas significativas do fármaco durante o processo de preparo das nanoesferas. Portanto, as mesmas formulações foram selecionadas para ensaios futuros de perfil de liberação prolongada e avaliação de toxicidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDAY, P Holland; DOGGET, Joseph Stone. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and status. **Drug design, development and therapy**, v. 11, January 2017. p. 273-293.

AMEEDUZZAFAR et al. Formulation and optimization of levofloxacin loaded chitosan nanoparticle for ocular delivery: In-vitro characterization, ocular tolerance and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, March 2018. p. 650-659.

AMMAR, Hussein O. et al. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. **AAPS PharmSciTech**, v. 10 (3), 2009. p. 808-19.

ANDREWS, Katherine T.; FISHER, Gillian; SKINNER-ADAMS, Tina S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v. 4 (2), Mar 2014. p. 95-111.

ANTCZAK, Magdalena; DZITKO, Katarzyna; DŁUGOŃSKA, Henryka. Human toxoplasmosis searching for novel chemotherapeutics. **Biomed. Pharmacother.** 2016; 82, 677–684.

ARAÚJO, J. et al. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, ed. 1, August 2009. p. 48-56.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; ROTHCHILD, Z. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. Vol. 4. Edusp, 2003.

BAHADORI, Moslem; MOHAMMADI, Forozan. Nanomedicine for respiratory diseases. **Tanaffos**, v. 11,4, 2012. P. 18-22.

BAIG, Mirza Salman et al. Application of Box-Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, April 2016. p. 258-270.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Distrito Federal: Guia de Bolso, 2010.

BRYDAK-GODOWSKA, Joanna et al. Management of toxoplasmic retinochoroiditis during pregnancy, postpartum period and lactation: clinical observations. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, Feb 2015. p. 598-603.

BULLEN, Hayley E. et al. A novel family of Apicomplexan glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, Sep 11, 2009.

CALVO, Pilar; VILA-JATO, José L.; ALONSO, María J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, ed 5, May1996. p.530

CALVO, Pilar; VILA-JATO, José L.; ALONSO, María J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, ed 1, 16 July 1997. p. 41-50.

CHANG, Rong-Kun; PRICE, James C.; WHITWORTH, Cleyde W. Dissolution characteristics of poly (ϵ -caprolactone)-polylactide microspheres of chlorpromazine. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 12, ed. 14, 1986. p. 2355-2380.

CHEW, Wai Kit et al. Significant reduction of brain cysts caused by *Toxoplasma gondii* after treatment with spiramycin administered with metronidazole in a mouse model of chronic toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemother.** V. 56, 4, 2012. p. 1762–1768.

CHOUDHURY, Himadri et al. The role of intravitreal trimethoprim/sulfamethoxazole in the treatment of toxoplasma retinochoroiditis. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.** V.; 46, 1, 2015. p.137-140.

COMMODARO, Alessandra G. et al. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**: Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, Mar 2009. P. 345-350.

COSTA, I. N. et al. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, v.30, ed. 10, October 2009. p. 884-890.

DAHER, Wassim et al. Concerted action of two formins in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 6 (10), October 2010.

DALTIN, Decio. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DAMICO, Francisco Max et al. Injeção intravítrea de polissorbato 80: estudo funcional e morfológico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n.6, 2017. p. 603-611.

DARD, Céline et al. Late diagnosis of congenital toxoplasmosis based on serological follow-up: A case report. *Parasitology International*, v. 66, ed. 2, April 2017. p. 186-189.

DAVOODI, Pooya; SRINIVASAN, Madapusi; WANG, Chi. Synthesis of intracellular reduction-sensitive amphiphilic poly(ethyleneimine) and poly (ϵ -caprolactone) graft copolymer for on-demand release of doxorubicin and p53 plasmid DNA. **Acta Biomater**, v. 39, 15 July, 2016. p. 79-93.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, sporozoites, and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11 (2), 1998. p. 267-299.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008. v.6, p.2951-2953

FERREIRA, Hadma Sousa; RANGEL, Maria do Carmo. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. Instituto de Química – Universidade Federal da Bahia. São Paulo: **Química Nova**, v. 32, no. 7, 2009.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, ed. 1, October 1989. p. R1-R4.

FLORENCE, Alexander T.; ALTWOOD, David. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Tradução Zuleika Rothschild e colaboradores, v. 4, LMC – São Paulo: Pharmabooks, 2011.

FORMARIZ, T. P. et al. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, ed. 1, August 2006. p. 54-61.

FRANCO, P.S. et al. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, ed. 11, 2011. p. 838-844.

GANGNEUX, Florence Robert. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, n. 68, Supplement 1, 2014. p. 125-133.

GANGNEUX, Robert et al. High level of soluble HLA-G in amniotic fluid is correlated with congenital transmission of *Toxoplasma gondii*. **Clinical Immunology**, v. 138, ed. 2, February 2011. p. 129-134.

GANGNEUX, Robert; DARDÉ, Florence Marie-Laure.. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 25 (2), 2012. p. 264-96.

GRATZL, R. et al. Treatment of toxoplasmosis in pregnancy: concentrations of spiramycin and neospiramycin in maternal serum and amniotic fluid. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, ed. 1, Jan 2002. p. 12-16.

GUITON, Pascale et al. An in vitro model of intestinal infection reveals a developmentally regulated transcriptome of *Toxoplasma* sporozoites and a NF- κ B-like signature in infected host cells. **PloS one**, v. 12 (3), Mar 2017.

GUPTA, Ram B.; KOMPELLA, Uday B. Nanoparticles Technology for Drug Delivery. Taylor & Francis. New York, v. 159, 2006.

HERRMANN, Daland C. et al. *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. **Vet Res**, v. 43 (1): 39, Apr 30, 2012.

HOET, Peter. H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, Irene; SALATA, Oleg. V. Nanoparticles - known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, n. 12, p. 1-15, 2004.

JINDAL, Animesh et al. The role of intravitreal trimethoprim/sulfamethoxazole in the treatment of toxoplasma retinochoroiditis. **Ophthalmic Surgery: Lasers Imaging Retina**, v. 46, 2015. P. 137-140.

JACOBSON, J. et al. et al. Dose-escalation, phase I/II study of azithromycin and pyrimethamine for the treatment of toxoplasmic encephalitis in AIDS. **AIDS**. 2001; 15:583-9

KREUTER, J. Nanoparticles - a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331(1), p. 1–10, 2007.

KUNDU, Biswanath et al. Development of New Localized Drug Delivery System Based on Ceftriaxone-Sulbactam Composite Drug Impregnated Porous Hydroxyapatite: A Systematic Approach for In Vitro and In Vivo Animal Trial. **Pharmaceutical Research**, v. 27, ed. 8, August 2010. p. 1659 – 1676.

LASAVE, André et al. Intravitreal clindamycin and dexamethasone for zone 1 toxoplasmic retinochoroiditis at twenty-four months. *Ophthalmology* 117: 1831–1838, 2010.

LOBATO, Kleidson. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3906–3912, 2013.

MAENZ, M. et al. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Prog Retin Eye Res.** 39:77–106, 2014

MARKIN, Alexander S. olidemyths. **Current Opinion in Microbiology**, v.11 (5), 2008. p. 414-421.

MAZZA, Orit et al. Intravitreal Trimethoprim and Sulfamethoxazole Toxicity to the Retina of Albino Rabbits. **Translational vision science & technology**, v. 7, 6 2. 14 Nov 2018.

McNEIL, Scott E. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**. Springer Protocols, 2011.

MELLO FILHO, Paulo Augusto de Arruda et al. Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças de vítreo, retina e coróide. São Paulo: **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 3, Junne 2010.

MELO-ESPINOSA, Eliezer Ahmed et al. Emulsified fuels based on fatty acid distillates and rapeseed oil: A physicochemical characterization. **Fuel**, v. 185, 2016. p. 734-742.

MILADI, Karin et al. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. In: Vauthier C.; Ponchel G. **Nanopartículas Poliméricas para Nanomedicines**. Springer, Cham, 2017. P. 17-53.

MONTAZERI, Mohbobeh et al. Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. *Microbiol frontal*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9:2587, 29 Oct 2018.

MONTOYA, JG; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. Seminar. **Seminário**, v. 363, ed. 9425, June 12, 2004. p. 1965–1976.

MORAES, Carolina Morales. **Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais**. 2009. Dissertação (mestrado em Bioquímica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. 63f.

MORAIS, Jacqueline Moreira et al. Physicochemical characterization of Canola oil/water nano-emulsion obtained by HLB number and Emulsion Phase Inversion Methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, ed. 1, 2006. P. 109-115.

MUCCIOLI, C; BELFORT R. Ocular Taxoplasmosis. In: PLEYER, U. FOSTER, CS. Uvetis and immunological disorders: essentials in ophthalmology. Berlin: **Springer**, Heidelberg, 2007. p. 131-143.

NEJADMANSOURI, Maryam et al. Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, October 2016. p. 821-832.

NETO, Bento Pereira da Costa. Desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/mdi para aplicações cosméticas. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009. p. 27

OZGONUL C.; BESIRLI C. Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. **Ophthalmic Res**, v. 57: n. 1-12, 2017.

PARK, Ju Hyang et al. Gold Nanocage-Incorporated Poly (ϵ -Caprolactone) (PCL) Fibers for Chemophothermal Synergistic Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 11, ed. 2, 2019.

PARK, Young-Hoon; NAM, Ho-Woo. Clinical features and treatment of ocular toxoplasmosis. **The Korean journal of parasitology**, v. 51, 4, Aug 2013.

PARRA, Alexander et al. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136 (1), December 2015. p. 935-943.

PISON, Ulrich et al. Nanomedicine for respiratory diseases. Elsevier: **European Journal of Pharmacology**, v. 533, ed. 1-3, 8 March 2006. p. 341 – 350.

PREVIATO, Mariana et al. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitor acute ocular toxoplasmosis. **BMC Research Notes**, v. 8 746, December 2015.

QUINTANAR-GUERRERO, David et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, ed. 12, 1998. p. 1113-1128.

RAMESH, D. Vijaya. Development of a process for microencapsulation of a model protein with poly (ϵ -caprolactone) using a modified W/O/O technique. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 23 (1), 2009. p. 46-54.

RIVAS, Claudia Janeth Martínez et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, ed. 1, 30 October 2017. p. 66-81.

ROSSI, Cátia Guaciara Fernandes Teixeira et al. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. Seropédica: **Revista Universitária Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1-2, 2006. p. 59-71.

SADAT, Sams M. A.; JAHAN, Sheikh; HADDADI, Azita. Effects of Size and Surface Charge of Polymeric Nanoparticles on in Vitro and in Vivo Applications. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 7 (2), 2016. p. 91-108.

SAKURAI, E. et al. Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics. **Ophthalmic Research**, v. 33 (1), 2001. p. 31-36.

SAMY, Karen E. et al. Co-Delivery of Timolol and Brimonidine with a Polymer Thin-Film Intraocular Device. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 35, n. 2, 15 Mar, 2019.

SCHAFFAZICK, Scheila R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. vol. 26, no. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMIDTS, T. et al. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 338, ed. 1, October 2009. p. 184-192.

SERRANTI, D.; BUONSENSO, D.; VALENTINI, P. Congenital toxoplasmosis treatment. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, 2011. p. 193-198.

SHARMA Sheweta et al. Surface-modified electrospun poly (epsilon-caprolactone) scaffold with improved optical transparency and bioactivity for damaged ocular surface reconstruction. *ArvoJournals: Investigative ophthalmology & visual science*, v. 55, ed. 2, February 2014.

SHI, X. G. et al. Structural identification of bitespiramycin metabolites in rat: a single oral dose study. **Xenobiotica: the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 35, ed. 4, 2005. p. 343-358.

SIBLEY, L. David; HÅKANSSON, Sebastian; CARRUTHERS, Vern B. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Current Biology*, v. 8, ed. 1, January 01, 1998. P. R12-R14.

SILVA, José Dilson F. et al. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Quim. Nova**, v. 38, no. 9, 2015. p. 1196-1206.

SIMSEK, Mert; OZDAL, Pinar Cakar; KOCER, Ali Mert. Optic nerve involvement in ocular toxoplasmosis: 12 year data from a tertiary referral center in Turkey. São Paulo: **Arquivos Brasileiros Oftalmol**, ahead of print Epub, April 08, 2019.

SMITH, Justine R. et al. Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Investigative ophthalmology & visual science: Immunology and Microbiology**, v. 45, ed. 4, April 2004.

SOHEILIAN, Masoud et al. Randomized trial of intravitreal clindamycin and dexamethasone versus pyrimethamine, sulfadiazine, and prednisolone in treatment of ocular toxoplasmosis. **Ophthalmology**, v. 118, ed. 1, January 2011. p. 134-141.

SOLDATI, Dominique; MEISSNER, Markus. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 16, ed. 1, February 2004. p. 32-40.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, São Carlos, v. 22, n. 1, 2012. p. 101-106.

SOUZA, Patrícia Moraes Sinohara et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, 2012. p. 132-137.

STEEL, C. Steel et al. Pathogen-and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

TAMJIDI, Fardin. et al. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 26, p. 366–374, dec 2014. ISSN 14668564.

TANAKA, Takemi et al. Nanotechnology for breast cancer therapy. **Biomedical Microdevices**, v. 11, 2009. p. 49-63.

TIAN, Xianbin et al. Roles of P-glycoprotein, Bcrp, and Mrp2 in biliary excretion of spiramycin in mice. **Antimicrobialagentsandchemotherapy**, vol. 51,9, 2007. p. 3230-3234.

VENTURINI, Cristina et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200 –208, 2011.

VERT, Michel. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, ed. 2, February, 2009. P. 437-446.

WANG, Jin-Lei et al. Advances in the Development of Anti-*Toxoplasma gondii* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 35, ed 3, march 01, 2019. p. 239-253.

WANG, Shanfeng et al. Synthesis and characterizations of biodegradable and crosslinkable poly (ϵ -caprolactone fumarate), poly (ethylene glycol fumarate), and their amphiphilic copolymer. **Biomaterials**, v. 27, ed. 6, February 2006. p. 832-841.

WANG, Ze-Xiang et al. Proteomic Differences between Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* Revealed by iTRAQ-Based Quantitative Proteomics. **Frontiers in microbiology**, v. 8:985. 2 Jun, 2017.

WHITE, Michael; RADKE, Jay R.; RADKE, Joshua B. *Toxoplasma gondii* development: turn the switch on or off? **Cellular Microbiol**, v. 16, ed. 4, 2014. P. 466–472. 2014.

WOODRUFF, Maria Ann; HUTMACHER, Dietmar Werner. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, ed. 10, October 2010. p. 1217-1256.

YACASI, Gladys Rosario Ramos et al. Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol. **International journal of nanomedicine**, v. 11, 23 August 2016. p. 4093-4103.

ZENG, Shinuan et al. Spiramycin and azithromycin, safe for administration to children, exert antiviral activity against enterovirus A71 in vitro and in vivo. Elsevier: **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 53, ed. 4, april 2019. p. 362 – 369.

ZHANG, Ying; CHAN, Hon; LEONG, Kam. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65 (1), 2013. p. 104-20.