



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
MARIA LUIZA SCHAEFER AZEVEDO



**ESTUDO INÉDITO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA E CITOTOXICIDADE DO
COPOLÍMERO PMMA-g-PEG 4000 E DERIVADOS INCORPORADOS COM O
FÁRMACO BENZNIDAZOL**

Ouro Preto

2019

MARIA LUIZA SCHAEFER AZEVEDO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Prof^a Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Kátia Monteiro Novack

Ouro Preto

2019

A994e Azevedo, Maria Luiza Schaefer .
Estudo inédito de liberação controlada e citotoxicidade do copolímero
PMMA-g-PEG 4000 e derivados incorporados com o fármaco Benznidazol
[manuscrito] / Maria Luiza Schaefer Azevedo. - 2019.

57f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Viviane Martins Rebello Santos.
Coorientadora: Profª. Drª. Kátia Monteiro Novack.

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

1. Chagas, Doença de. 2. Medicamentos. 3. Polímeros. I. Santos, Viviane
Martins Rebello. II. Novack, Kátia Monteiro. III. Universidade Federal de
Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



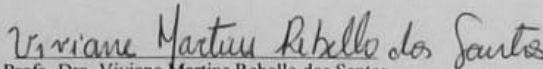
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

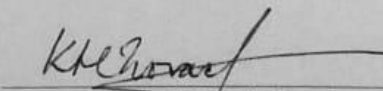
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

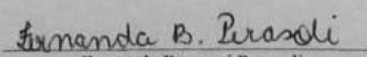
Escola de Farmácia

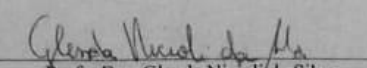


ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 483ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 12 dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, quinta-feira, realizou-se, a partir das 13 horas e 30 minutos, no auditório do Bloco de Salas, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Maria Luiza Schaefer Azevedo**, matrícula **15.1.2109**, intitulada **“Estudo inédito de liberação controlada e citotoxicidade do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e derivados incorporados com fármaco benzinidazol”**. A banca examinadora foi constituída pela doutoranda Fernanda Barçanti Perasoli (CIPHARMA/UFOP), pela co-orientadora Profa. Dra. Kátia Monteiro Novack (DEQUI/UFOP) e pela orientadora Profa. Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos (DEQUI/UFOP). De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua APROVAÇÃO, com a NOTA 9,5. Comunicou-se ao candidato 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), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da banca examinadora e pela presidente do colegiado. Ouro Preto, 12 de dezembro de 2019.


Profa. Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos


Profa. Dra. Kátia Monteiro Novack


Fernanda Barçanti Perasoli


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

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais e meus irmãos, pois sem eles nada disso seria possível, por todo apoio, carinho, compreensão e incentivo a sempre estudar mais, aprender e correr atrás dos meus objetivos. Ao meu avô, que nos deixou recentemente, e minha tia por terem me acolhido com tanto carinho quando cheguei a Ouro Preto e sempre terem sido meu ponto de apoio durante a graduação.

Às minhas orientadoras Viviane e Kátia, que me ensinaram tanto ao longo desses 4 anos, me incentivaram e me deram oportunidade de participar de congressos e ir em busca de mais conhecimento, com isso fizeram eu me apaixonar ainda mais pela pesquisa.

Aos meus companheiros de laboratório Lucas, Ayron e Juliana pelo apoio, auxílio nas análises, momentos de descontração e pela amizade.

Às amigadas que a farmácia me proporcionou, principalmente os Trilheiros e o “grupo que não deve ser nomeado” por terem sido ombro amigo, companheiros de estudos, de beber de boa e por nunca terem me deixado desistir desse sonho, levarei vocês sempre comigo.

Ao Centro Acadêmico Livre de Farmácia – José Badini, por tantas experiências enriquecedoras, por terem me ensinado muito sobre trabalho em equipe e me ajudado a crescer como pessoa.

Por fim, à Universidade Federal de Ouro Preto e em especial à Escola de Farmácia pelo ensino de qualidade e aos docentes por terem me passado seus enriquecedores conhecimentos.

RESUMO

Os polímeros são macromoléculas e possuem estrutura química caracterizada por unidades (monômeros) ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia. Devido a suas propriedades particulares, eles têm sido usados, dentre outras coisas, para transportar fármaco dentro da matriz polimérica diretamente até o local de ação. Esse sistema é denominado de liberação controlada de fármacos. Esse sistema possui como objetivo manter constante a concentração sanguínea de um determinado fármaco, assegurar uma maior biodisponibilidade e reduzir efeitos colaterais, realçando assim a adesão do paciente ao tratamento com um menor número de dosagens requeridas. O copolímero PMMA-g-PEG quando incorporado a um fármaco pode atuar desta forma e principalmente levar o fármaco até o local de ação. Foram realizadas reações de modificações no copolímero sendo essas de acetilação, halogenação, esterificação seguida de hidrólise e etilação. Posterior a isso, o copolímero foi incorporado ao fármaco benznidazol. Tanto o copolímero PMMA-g-PEG 4000 quanto o mesmo modificado e incorporado com o fármaco, foram caracterizados e avaliados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (FM), difração de raio x (DRX). Foi realizado o ensaio de citotoxicidade dos copolímeros incorporados para avaliar se os mesmos são tóxicos para as células. Por fim foi feito o ensaio de liberação controlada em solução tampão de pH 3,0 e pH 7,3 que mimetizam o pH estomacal e sanguíneo. Foi obtido como resultado que todas as reações de incorporação foram efetivas e nenhum dos copolímeros foram tóxicos para as células no ensaio de citotoxicidade. Com relação a liberação controlada, todos os derivados do copolímero obtiveram curva com perfil de liberação controlada tanto no pH 7,3 quanto em 3,0.

Palavras-chave: Benznidazol, doença de Chagas, PEG4000, PMMA-g-PEG4000, MEV, liberação controlada, citotoxicidade.

ABSTRACT

Polymers are macromolecules and have a chemical structure characterized by covalently linked units (monomers), repeated regularly along the chain. Due to their particular properties, they have been used, among other things, to transport drug within the polymeric matrix directly to the site of action. This system is called controlled drug release. This system aims to keep the blood concentration of a given drug constant, ensure greater bioavailability and reduce side effects, thus enhancing patient compliance with treatment with a lower number of required dosages. The PMMA-g-PEG copolymer when incorporated into a drug may act in this manner and mainly bring the drug to the site of action. Modification reactions were performed on the copolymer, such as acetylation, halogenation, esterification and ethylation. Subsequently, the copolymer was incorporated into the drug benznidazole. Both PMMA-g-PEG 4000 copolymer and the same modified and incorporated with the drug were characterized and evaluated by infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AF), diffraction x-ray (XRD). The cytotoxicity assay of the incorporated copolymers was performed to assess whether they are toxic to living organisms. Finally, the controlled release assay was performed in a pH 3.0 and pH 7.3 buffer solution that mimics the stomach and blood pH. As a result, all incorporation reactions were effective and none of the copolymers were toxic to cells in the cytotoxicity assay. Regarding controlled release, all copolymer derivatives obtained controlled release curve at pH 7.3 and 3.0.

Keywords: Benznidazole, Chagas disease, PEG4000, PMMA-g-PEG4000, SEM, controlled release, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Curvas hipotéticas de nível-tempo do fármaco no sangue, para uma forma farmacêutica sólida convencional e um produto com liberação controlada..... | 20 |
| Figura 2: (A) microesfera; (B) microcápsula. | 21 |
| Figura 3: Estrutura química da metilcelulose..... | 21 |
| Figura 4: Fórmula estrutural do polietilenoglicol (PEG)..... | 23 |
| Figura 5: Estrutura química (1) metacrilato de metila e (2) polimetacrilato de metila. | 23 |
| Figura 6: Estrutura química do fármaco Benznidazol..... | 25 |
| Figura 7: Reações adversas ao benznidazol que levaram suspensão do tratamento: A) Paciente do sexo feminino 38 anos de idade apresentou placas eritematosas no 15º dia de tratamento. B) Paciente do sexo masculino 46 anos de idade apresentou dermatite exfoliativa no 10º dia de tratamento. C) Paciente do sexo feminino 32 anos de idade apresentou erupção cutânea no 25º dia de tratamento. D) Paciente do sexo masculino 46 anos de idade apresentou edema nas extremidades com bolhas no 10º dia de tratamento..... | 26 |
| Figura 8: Síntese do copolímero Fonte: ROSA, 2014..... | 28 |
| Figura 9: Síntese dos derivados do copolímero Fonte: Adaptado de ROSA, 2014..... | 30 |
| Figura 10: Incorporação do Benznidazol nos copolímeros..... | 31 |
| Figura 11: Aspectos físicos dos copolímeros antes da incorporação. Respectivamente COP, COP ACET, COP EST, COP ETI e COP HAL..... | 36 |
| Figura 12: Aspecto físico dos copolímeros incorporados: COP BZ (A), COP ACET BZ (B), COP EST BZ (C), COP ETI BZ (D), COP HAL BZ (E)..... | 36 |
| Figura 13: Fotomicrografias do copolímero PMMA-g-PEG 4000 em 100, 50 e 10 µm..... | 39 |
| Figura 14: Fotomicrografias dos copolímeros COP ACET em 100µm (A), COP EST em 100 µm (B), COP ETI em 20 µm (C) e COP HAL em 10 µm (D) respectivamente..... | 39 |
| Figura 15: Fotomicrografias do Benznidazol (A), COP BZ (B), COP ACET BZ (C), COP EST BZ (D), COP ETI BZ (E) e COP HAL BZ (F)..... | 40 |
| Figura 16: Espectro de infravermelho do fármaco Benznidazol..... | 41 |
| Figura 17: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), Benznidazol incorporado ao PMMA-g-PEG 4000 (COP BZ) e Benznidazol..... | 42 |
| Figura 18: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Esterificado (COP EST), PMMA-g-PEG 4000 Esterificado incorporado (COP EST BZ) e benznidazol..... | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 19: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Halogenado (COP HAL), PMMA-g-PEG 4000 Halogenado Incorporado (COP HAL BZ) e benznidazol | 43 |
| Figura 20: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Etilado (COP ETI), PMMA-g-PEG 4000 Etilado incorporado (COP ETI BZ) e benznidazol,..... | 43 |
| Figura 21: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Acetilado (COP ACET), PMMA-g-PEG 4000 Acetilado Incorporado (COP ACET BZ) e benznidazol | 44 |
| Figura 22: Microscopia de força atômica dos copolímeros. COP (A), COP ACET (B), COP EST (C), COP ETI (D), COP HAL (E), COP BZ (F), COP ACET BZ (G), COP EST BZ (H), COP ETI BZ (I) e COP HAL BZ (J)..... | 45 |
| Figura 23: Difratoograma de raio X dos copolímeros | 46 |
| Figura 24: Difratoograma de raio X dos copolímeros incorporados com o fármaco e o benznidazol puro..... | 47 |
| Figura 25: Gráficos de curva padrão dos copolímeros incorporados em pH 3,0 | 48 |
| Figura 26: Gráficos de curva padrão dos copolímeros incorporados em pH 7,3 | 49 |
| Figura 27: Gráfico de liberação controlada dos copolímeros incorporados em pH 3,0 | 50 |
| Figura 28: Gráfico de liberação controlada dos copolímeros incorporados em pH 7,3 | 51 |
| Figura 29: Gráfico de viabilidade celular dos copolímeros..... | 52 |
| Figura 30: Gráfico de viabilidade celular dos copolímeros incorporados..... | 52 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais polímeros sintéticos de uso farmacêutico e suas aplicações.....22

Tabela 2: Solubilidade dos copolímeros e do fármaco em diferentes solventes orgânicos.....37

LISTA DE ABREVIACOES

PEG - Polietilenoglicol

PMMA – Polimetacrilato de Metila

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho

FM – Microscopia de Força Atômica

DRX – Difraco de Raio X

COP – PMMA-g-PEG 4000

COP ACET – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Acetilado

COP EST – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Esterificado

COP ETI – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Etilado

COP HAL – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Halogenado

COP BZ – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Incorporado

COP ACET BZ – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Acetilado Incorporado

COP EST BZ – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Esterificado Incorporado

COP ETI BZ – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Etilado Incorporado

COP HAL BZ – Copolímero PMMA-g-PEG 4000 Halogenado Incorporado

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 16 |
| OBJETIVOS..... | 17 |
| Objetivo Geral | 17 |
| Objetivos Específicos | 17 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 18 |
| 3.1 Liberação controlada de fármacos | 18 |
| 3.2 Polímeros para uso na liberação controlada | 20 |
| 3.3 Doença de Chagas..... | 24 |
| 3.4 Fármaco Benznidazol | 25 |
| 3.5 Liberação modificada do Benznidazol | 27 |
| METODOLOGIA..... | 28 |
| 1. Materiais Utilizados..... | 28 |
| 2. Síntese dos copolímeros (ROSA, 2014)..... | 28 |
| 2.1 Síntese do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP) | 28 |
| 2.2 Acetilação do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP ACET) | 28 |
| 2.3 Esterificação seguida de hidrólise do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP EST) | 29 |
| 2.4 Etilação do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP ETI) | 29 |
| 2.5 Halogenação do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP HAL)..... | 29 |
| 3. Extração do Benznidazol..... | 30 |
| 4. Teste de Solubilidade | 30 |
| 5. Incorporação do Benznidazol aos copolímeros (AZEVEDO, 2018) | 31 |
| 6. Ensaio de eficiência de incorporação | 32 |
| 7. Solução Tampão | 32 |

| | |
|---|----|
| 7.1 Tampão de pH 3,0 | 32 |
| 7.2 Tampão de pH 7,3 | 33 |
| 8. Curva Padrão | 33 |
| 9. Liberação Controlada | 33 |
| 10. Ensaio de Viabilidade Celular | 33 |
| 11. Caracterizações | 34 |
| 11.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 34 |
| 11.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) | 35 |
| 11.3 Microscopia de Força atômica (FM) | 35 |
| 11.4 Difração de Raio X (DRX) | 35 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 1. Sínteses dos Copolímeros e Incorporações com o fármaco | 36 |
| 2. Teste de Solubilidade | 36 |
| 3. Eficiência de Incorporação | 38 |
| 4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 39 |
| 5. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) | 40 |
| 6. Microscopia de Força Atômica (FM) | 44 |
| 7. Difração de Raio X (XRD) | 46 |
| 8. Curva Padrão | 47 |
| 9. Liberação Controlada | 49 |
| 10. Ensaio de Viabilidade Celular | 51 |
| CONCLUSÃO | 53 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

1. INTRODUÇÃO

Polímeros são macromoléculas que podem ser naturais ou sintéticas, compostas por dezenas de milhares de unidades de repetição denominadas meros que são ligadas por ligação covalente. Em função do alto peso molecular e da longa cadeia de átomos, os polímeros adquirem propriedades intrínsecas no que se refere às interações inter e intramoleculares (CANEVAROLO JR., SEBASTIÃO V, 2006; OLIVEIRA, R.B,2006).

No âmbito farmacêutico os polímeros têm seu uso bem estabelecido como excipientes farmacêuticos em cosméticos e em medicamentos. Com o avanço das pesquisas na área polimérica e com o conhecimento de suas propriedades versáteis, foi descoberto seu uso como revestimento para medicamentos. Sua aplicação vai desde um revestimento para mascarar sabor até como matriz para carrear fármacos potentes, mas com potencial tóxico, para atuarem direto no local de ação. (VILLANOVA; OREFICE; CUNHA, 2010)

O fármaco utilizado neste estudo é o Benznidazol, que é o medicamento de primeira escolha para o tratamento da fase aguda da Doença de Chagas se mostrando bastante efetivo nessa fase, porém com relatos de baixa ou nenhuma eficácia na fase crônica. Ele está disponível mundialmente e no Brasil existem apenas duas apresentações comerciais, ambas de liberação imediata: comprimidos de uso adulto de 100 mg e comprimidos de uso pediátrico de 12,5 mg. Apesar da sua conhecida efetividade, têm sido reportados severos efeitos adversos associados à utilização desse fármaco, tendo como consequência, muitas vezes, a interrupção do tratamento medicamentoso. (DNDi, 2012)

O PEG (polietilenoglicol) 4000 é um polímero amplamente usado na área farmacêutica e cosmética, principalmente como excipiente em formulações e até mesmo como ativo. Ao unir esse polímero a outro, o PMMA (polimetacrilato de metila), obtemos um copolímero que une as características e propriedades de seus dois precursores. Isso faz com que melhore o potencial farmacológico ativo já existente no polímero e viabilize seu uso na terapêutica. (S.J. ROSA. et al, 2014; OLIVEIRA, R.B 2014). Além disso, o uso destes polímeros como agente carreador, pode melhorar a efetividade do medicamento na fase crônica da doença, pois poderá permitir que o princípio ativo chegue até o parasita já instalado no coração.

Conseqüentemente, espera-se uma melhora na adesão do paciente ao tratamento e uma diminuição no número de tomada de doses por dia.

A finalidade do projeto é desenvolver uma matriz polimérica a partir do PMMA-g-PEG que seja capaz de carrear e liberar de forma controlada o fármaco Benznidazol a fim de diminuir ou até mesmo anular seus efeitos adversos.

2. JUSTIFICATIVA

Devido as propriedades particulares dos polímeros, eles têm sido usados na área farmacêutica para transportar o fármaco dentro da matriz polimérica diretamente até o local de ação ou liberar pequenas doses de forma controlada ao longo do tempo. Esses sistemas são denominados respectivamente como *drug delivery system*, ou seja, liberação controlada de fármacos. O interesse dos pesquisadores nessa área se dá devido a diminuição dos efeitos adversos promovidos pelo medicamento e conseqüentemente aumentar a adesão do paciente ao tratamento.

O copolímero (PMMA-g-PEG) do presente estudo é transparente, resistente, tem boa solubilidade em solventes orgânicos e tem baixa toxicidade, características que são resultado da união das propriedades do PMMA e do PEG. Devido a tais propriedades, o copolímero se torna tecnicamente viável para ser utilizado como veículo no Sistema de Liberação de Fármacos (SLF).

O fármaco utilizado neste estudo é o Benznidazol pertencente à classe dos antiparasitários. Seu mecanismo de ação se dá pelo aumento da produção de citocinas que causam a lise celular. Porém, os metabólitos produzidos pelo Benznidazol são muito reativos no organismo e atuam em outros sistemas, causando assim efeitos adversos severos. O tratamento contra a Doença de Chagas com o Benznidazol requer de duas a três administrações por dia, durante 60 dias, em média. A associação do longo período de uso, a frequência de administrações diárias e a série de efeitos adversos causados, são fatores que contribuem significativamente para o abandono da terapia pelo paciente. Com isso se torna de grande importância a realização de estudos de novas formulações e principalmente de liberação controlada para que melhore a adesão dos pacientes ao tratamento.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a incorporação do benznidazol na cadeia do PMMA-g-PEG 4000 e derivados, para posterior liberação controlada do fármaco com a finalidade de diminuir a toxicidade e melhorar a adesão do paciente ao tratamento

Objetivos Específicos

- Realizar as reações de acetilação, halogenação, esterificação seguida de hidrólise e alquilação na cadeia do copolímero PMMA-g-PEG4000.
- Realizar incorporações do fármaco benznidazol nas matrizes poliméricas.
- Caracterizar por DRX o copolímero PMMA-g-PEG 4000 e seus derivados após a incorporação do benznidazol.
- Caracterizar por espectroscopia de infravermelho (FTIR) o copolímero PMMA-g-PEG 4000 e seus derivados puros e incorporados com o benznidazol
- Avaliar a incorporação do fármaco nas matrizes poliméricas por Microscopia de Força Atômica (FM).
- Avaliar todas as matrizes poliméricas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Realizar o ensaio de liberação controlada do fármaco benznidazol nas matrizes poliméricas.
- Analisar o perfil da curva de liberação para que esteja dentro dos requisitos de uma liberação controlada.
- Quantificar o fármaco incorporado nas matrizes poliméricas.
- Avaliar a citotoxicidade do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e seus derivados puros e incorporados com o benznidazol.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Liberação controlada de fármacos

Desde o fim da década de 1940 e início da década de 1950 vem sendo estudados e desenvolvidos medicamentos que possuem sistema de liberação modificada. Segundo Allen Jr; Popovich; Ansel (2007) esse termo é usado para descrever formas farmacêuticas que possuem características de liberação com base no tempo, duração e/ou na localização de ação do medicamento.

As principais razões para se pesquisar sistemas de liberação modificada estão em encontrar formas de minimizar ou amenizar os efeitos indesejados dos fármacos. Eles podem ser decorrentes de ligações do fármaco fora de seus sítios específicos de ação, baixa especificidade, baixa biodisponibilidade, difícil solubilidade, baixa penetração intercelular, entre outros. Uma vez que o sistema de liberação modificada consiga melhorar essas características do fármaco, há uma melhora no índice terapêutico do medicamento, na eficácia e assim, melhora a adesão do paciente ao tratamento. É importante destacar também as características de um sistema de liberação de fármaco ideal, que não deve ser tóxico e nem gerar produtos de degradação que possam ser metabolizados pelo organismo, deve manter o fármaco estável, responder a estímulo para a liberação do fármaco e ser de fácil obtenção. (CHAVES 2017) (OLIVEIRA, 2015)

A partir do desenvolvimento dessas novas formas de liberação modificada, diversos termos foram sendo criados e usados para denominar os tipos de liberação, sendo eles: liberação sustentada, liberação prolongada, liberação controlada, entre outros. Liberação prolongada é definida pela Food and Drug Administration (FDA) como a forma farmacêutica que permite a redução na frequência das administrações necessárias e relação a um fármaco de liberação imediata. Já liberação controlada é definida como um sistema que libera porções do fármaco por um período definido de tempo. Por fim, liberação sustentada são preparados com revestimentos que se dissolvem lentamente, podendo ser suspensões, emulsões ou complexos (RODRIGUES, 1999).

Quando se compara os sistemas de liberação controlada com os convencionais, a principal diferença é que no último são necessárias administrações repetidas para manter a concentração plasmática do fármaco dentro da concentração terapêutica. Para que o fármaco

apresente suas propriedades e atinja seu objetivo terapêutico a concentração plasmática deve estar acima da concentração mínima eficaz (CME). A CME nada mais é do que o valor da concentração do fármaco no organismo que ele apresentará sua ação terapêutica, sendo indispensável para que a ação clínica do fármaco seja alcançada. Como o sistema convencional exige repetidas administrações, em vários momentos a concentração do fármaco cai abaixo da CME, exigindo a administração da próxima dose para que volte a obter valor terapêutico. Além disso, se as administrações não são feitas regularmente, e desrespeitando os horários pré-definidos, os níveis plasmáticos do fármaco também ficam fora da CME, não exercendo sua função. Além da CME existe a concentração mínima tóxica (CMT) que é a concentração na qual o fármaco passa a ser tóxico para o organismo. Com isso, aumentar o número de administrações para atingir por mais tempo a CME, além de piorar a adesão do paciente ao tratamento, pode levar a toxicidade, visto que a concentração estaria próxima da CMT. Atingir essa concentração significa aumentar, e muito, as chances de aparecimento de efeitos adversos e até mesmo de prejuízos graves para o paciente (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Esses conceitos podem ser melhores entendidos na Fig 1., na qual há a representação tanto da curva de liberação convencional quanto da de liberação controlada, além de mostrar a CMT e a CME. É possível ver que para fármacos com rápida absorção e eliminação, ou seja liberação convencional, leva a um rápido aumento e queda de concentração (curva de linha pontilhada). Caso fossem administradas múltiplas doses em intervalos regulares levaria a concentrações oscilantes do fármaco que poderiam ser fora da janela terapêutica caso o tempo da próxima dose não seja respeitado. Já na liberação controlada há um aumento da concentração plasmática do fármaco, porém após um tempo ela se mantém constante no plasma por mais tempo, requerendo uma nova dosagem em um tempo maior. Com isso, a concentração plasmática do fármaco se mantém por mais tempo dentro da janela terapêutica, diminuindo as chances de ultrapassar a concentração máxima tóxica ou de ficar abaixo da concentração mínima eficaz. O fato de esse tipo de liberação exigir um menor número de tomadas de dose faz com que melhore a adesão do paciente evitando o esquecimento da tomada de dose. (SIEGEL; RATHBONE, 2012), (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2007).

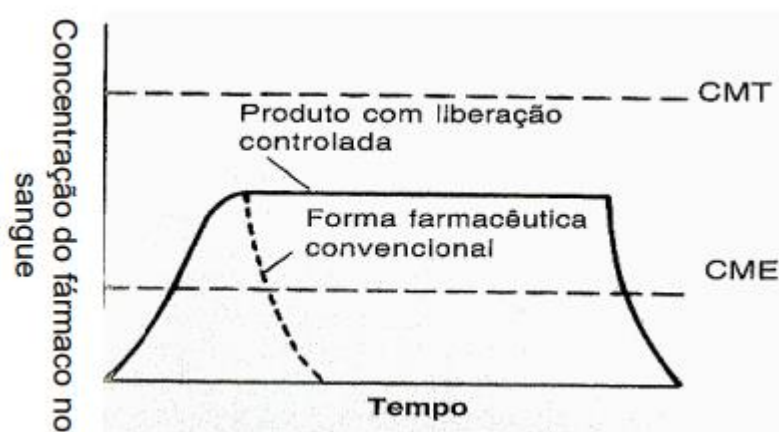


Figura 1: Curvas hipotéticas de nível-tempo do fármaco no sangue, para uma forma farmacêutica sólida convencional e um produto com liberação controlada

Além da diminuição do número de doses, esse sistema pode servir como vetor, levando o fármaco para o sítio de ação específico, permitindo a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias. Com isso as formas farmacêuticas que possuem esse sistema têm maior margem de segurança, uma vez que o organismo não entra em contato com altas concentrações do fármaco. Outra vantagem é a melhora da estabilidade do fármaco, uma vez que o vetor protege o princípio ativo do ácido gástrico (GUTERRES et al, 2003) (MAURO, 2007).

3.2 Polímeros para uso na liberação controlada

Os polímeros, principalmente aqueles que já são usados em sistemas biológicos, têm sido muito usados em sistemas de liberação, pois são capazes de ajustar a velocidade da liberação do fármaco de acordo com a necessidade fisiológica. Esses sistemas são amplamente aplicados na forma de micropartículas, podendo ser elas microesferas ou microcápsulas. A principal diferença entre elas está na forma que cada uma carrega o fármaco e o libera. Outra diferença significativa é em relação ao tamanho das partículas, sendo que entre 0,001 e 0,2 μm pode-se considerar nanocápsula, enquanto entre 1 e 100 μm já é considerado microesfera. Como pode ser visto na Fig 2, as microesferas são compactas e o princípio ativo se encontra distribuído em meio a rede polimérica. Já as microcápsulas são partículas que englobam o fármaco e o mantem recoberto por uma camada polimérica espessa. (SUAVE, et al, 2006)

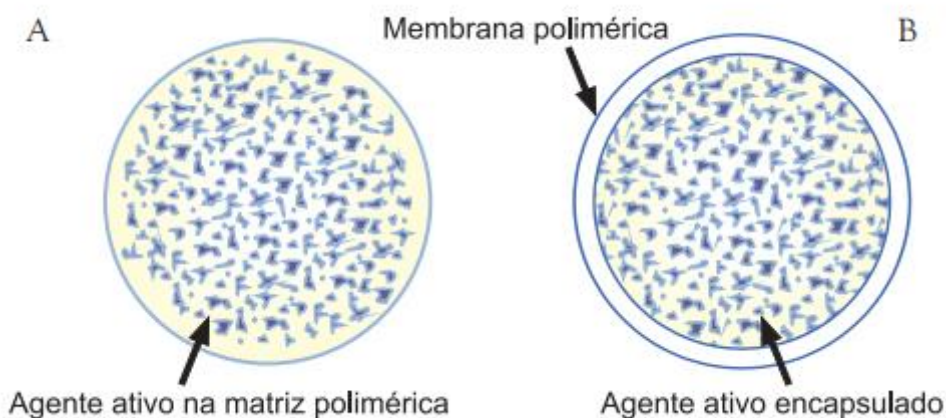


Figura 2: (A) microesfera; (B) microcápsula.
Fonte: SUAVE et al, 2006

O sistema funciona de forma que a matriz polimérica pode envolver o fármaco e encapsulá-lo em seu interior, ou ter a substância ativa dispersa e dissolvida por ela. Com isso evita que o princípio ativo entre em contato com receptores em locais que não sejam aqueles destinados a sua ação terapêutica e também faz com que o fármaco seja liberado lentamente. Além disso, pode melhorar a distribuição do fármaco, visto que quase nenhuma parte será perdida em locais indesejados, tornando possível que o máximo de princípio ativo chegue até o local desejado. Outra função desse sistema é manter a concentração plasmática do fármaco constante, evitando picos e diminuindo o número de tomadas de dose por período. É uma vantagem muito grande quando se pensa em fármacos com baixo índice terapêutico ou quando se considera a adesão do paciente a um tratamento que leva várias tomadas por dia (CHAVES 2017).

A lista de polímeros utilizados na área farmacêutica e principalmente em sistemas de liberação modificada é extensa, englobando tanto polímeros naturais quanto sintéticos, como é possível visualizar na tabela 1. Com relação ao uso em sistemas de liberação, os mais utilizados são os derivados de celulose, como o metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose e os metacrílicos e acrílicos apresentados na Fig 3. (LOPES, 2005)

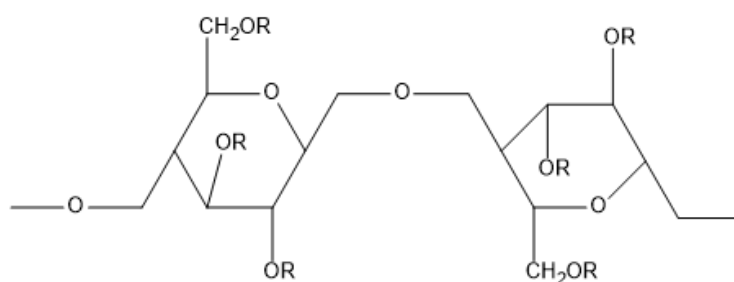


Figura 3: Estrutura química da metilcelulose.
Fonte: do autor

Tabela 1: Principais polímeros sintéticos de uso farmacêutico e suas aplicações.

| Polímero | Uso |
|--|---|
| Poli(álcool vinílico) | Estabilizante de emulsões e agente de revestimento. Utilizado em formas transdérmicas e oftálmicas |
| Poli(óxido de etileno) | Agente incrementador da viscosidade, aglutinante e mucoadesivo |
| Hidroxietilcelulose | As funções principais são como incrementadores da viscosidade e como agentes de revestimento |
| Hidroxipropilcelulose | Desintegrante e aglutinante para sólidos. Membranas para adesivos transdérmicos |
| Etilcelulose | Atua como incrementador da viscosidade, como aglutinante e como modulador da liberação de fármacos. |
| Copolímero do etileno e acetato de vinila | Empregado na fabricação de membranas para sistemas transdérmicos |
| Copolímero metil vinil éter e anidrido maléico | Revestimentos entéricos, liberação controlada e sistemas transdérmicos |

Fonte: Adaptado de VILLANOVA, 2010

O polietilenoglicol (PEG) (Fig 4) apresenta-se com peso molecular que varia de 200 a mais de 10000 Daltons. Tal variação está diretamente relacionada com seu estado físico, sendo que os de menor peso molecular são líquidos enquanto os maiores são sólidos brancos. É um polímero hidrossolúvel uma vez que os pares de elétrons presentes na molécula de oxigênio interagem com os hidrogênios por pontes de hidrogênio, resultando na hidratação da molécula e de outras estruturas nas quais ele se fixa.

Além disso, é um polímero com boa solubilidade em solventes orgânicos, baixa toxicidade, não antigênico e não imunogênico, o que são propriedades essenciais para seu uso em

formulações farmacêuticas. (CASTANHO, 2009), (CHIENG, *et al* 2013), (PARRA, *et al* 2006).

Ele também é um polímero farmacologicamente ativo, usado para constipação intestinal infantil. Uma vez que é hidrofílico ele aumentando a quantidade de água no intestino por intumescimento e promove o aumento do bolo fecal, facilitando a evacuação.

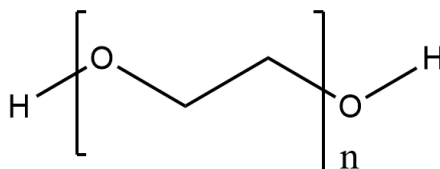


Figura 4: Fórmula estrutural do polietilenoglicol (PEG)

Fonte: Adaptada de CASTANHO, 2009

O polimetacrilato de metila (PMMA), representado na Fig. 5, é um polímero amplamente utilizado na fabricação de materiais para uso médico cirúrgico. Essa aplicação se deve a sua alta compatibilidade com o tecido humano e sua não toxicidade e não irritabilidade. Além disso, o PMMA possui boa resistência a solventes, é termoplástico, transparente e incolor, possui ótimas propriedades óticas, alta resistência, é leve e fácil de adquirir formas, o que o torna um dos polímeros com maior qualidade no mercado para diversos fins. (AQUINO, 2005; FREITAS, 2014)

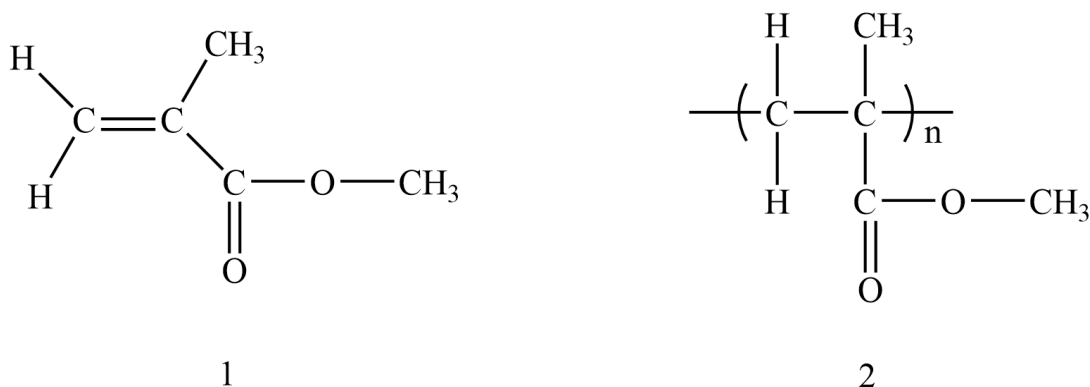


Figura 5: Estrutura química (1) metacrilato de metila e (2) polimetacrilato de metila.

Fonte: Adaptado de AQUINO, 2005

A união das características descritas de seus precursores, torna viável o uso do PMMA-g-PEG como um biopolímero para a área farmacêutica, uma vez que ele tem as características dos seus precursores como transparência, resistência, baixa toxicidade e fácil processamento. Mais do que isso, sua utilidade em sistemas de liberação de fármacos torna-se muito grande. Além disso, a realização de modificações nas cadeias destes polímeros visa melhorar mais ainda a afinidade da matriz com o fármaco, auxiliando no processo de liberação. (NOVACK 2002), (AZEVEDO, *et al*, 2018)

3.3 Doença de Chagas

A Doença de Chagas é uma doença parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi*, que é um flagelado da classe *Zoomastigophorea*. A espécie *cruzi* é subdividida em seis linhagens (I – VI), sendo que as diferenças entre as cepas são em relação ao grau de virulência, comportamento, tropismo e variações na sensibilidade a fármacos, tanto para modelos animais quanto humanos sendo considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), principalmente por atingir a população que vive em situação precária e nas regiões mais pobres do mundo, como a América Latina. A transmissão se dá pelo contato das fezes contaminadas do barbeiro com o orifício da picada do inseto, por transfusão de sangue contaminado ou na gravidez, de mãe para filho. Outra forma que de transmissão descrita é a oral, pelo consumo de caldo de cana ou açaí moído que, por má higiene, contenham o inseto contaminado e assim o parasita entra de forma ativa pelo sistema digestivo. (DNDi, OMS, 2012) (DAVANÇO, 2015)

A doença é dividida em fase aguda e crônica sendo a primeira, na maioria dos pacientes, assintomática. Na fase aguda os sintomas, quando ocorrem, duram até quatro meses e podem incluir erupções de pele e nódulos inflamatórios, febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, náuseas, diarreia, vômito e dificuldade para respirar. Já a fase crônica, que ocorre após a aguda, pode durar anos ou até décadas, há parasita nos órgãos, o paciente é assintomático mas transmite a doença. No fim da fase crônica há a progressão para um estágio final da doença no qual o paciente sofre danos cardíacos, o que resulta em morte súbita ou insuficiência cardíaca progressiva (DNDi).

Atualmente existem apenas dois medicamentos registrados disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, que são os mesmos há 21 anos, sendo eles o nifurtimox e o benznidazol. No mercado brasileiro apenas o benznidazol está disponível, uma vez que devido aos severos efeitos colaterais o nifurtimox foi retirado do mercado. Principalmente por ser uma doença negligenciada não há investimento das indústrias farmacêuticas em pesquisa e desenvolvimento de fármacos para a doença de Chagas. O fármaco escolhido neste trabalho foi o fármaco benznidazol, devido à disponibilidade no mercado Nacional.

3.4 FÁRMACO BENZNIDAZOL

O benznidazol (2-Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida), representado na Fig 6, surgiu por volta de 1971 e é hoje o único medicamento mundialmente disponível para o tratamento da doença de Chagas. Até 2003 ele era produzido exclusivamente pela Roche®, que após essa data cedeu a patente ao governo brasileiro. Hoje ele é produzido exclusivamente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), que é o segundo maior laboratório farmacêutico público do país. Estão disponíveis duas apresentações, sendo uma de uso adulto (100 mg) e a outra uso pediátrico (12,5 mg).

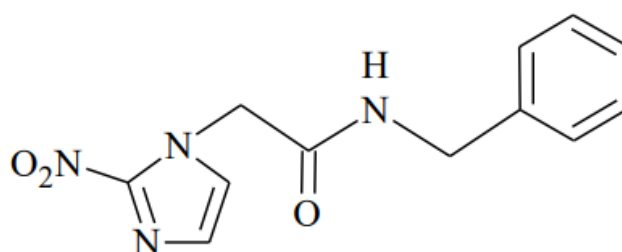


Figura 6: Estrutura química do fármaco Benznidazol
Fonte: Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, 2019

O mecanismo de ação desse fármaco ainda não é completamente conhecido, mas de acordo com estudos ele está relacionado a intermediários radiculares, produzido pela ação das nitro-redutases humanas, e metabólitos nucleofílicos. Esses radicais livres que exercem o efeito tripanocida, pois têm efeito direto no DNA do parasito, inibindo a síntese de proteínas e a síntese de ácido ribonucleico nas células do *T. cruzi*. Outro mecanismo de ação seria através da elevação da produção da citocina interferon gama que induz a fagocitose e consequentemente causa a lise celular. (LAFEPE e DAVANÇO, 2015)

Segundo o LAFEPE os pacientes em tratamento devem ficar sob observação ambulatorial e apesar de apresentar boa tolerância tanto em adultos quanto em crianças, as reações adversas ocorrem em 25 a 30% dos pacientes, podendo chegar a mais de 60% se o esquema terapêutico for prolongado. Dentre as reações mais frequentes estão dermatopias por hipersensibilidade, que podem surgir por volta do 9º dia de tratamento e se manifesta como eritema polimorfo não bolhoso, pruriginoso e seguido de descamação. Além disso, náuseas, vômitos, diarreia e cólica intestinal também são muito comuns, principalmente na fase inicial do tratamento. Foi

observado também cefaleia, vertigem, fadiga, edema de extremidades e alteração de enzimas hepáticas, porém com menor frequência. (LAFEPE)

Pontes e colaboradores realizaram um estudo que avaliou as reações adversas em pacientes com doença de Chagas que foram tratados com o Benznidazol. Nesse estudo participaram 32 pacientes com infecção chagásica e que foram monitorados durante 60 dias de tratamento. Como resultado foi verificado que apenas 4 não apresentaram reações adversas contra 28 que apresentaram alguma reação durante o tratamento. Além disso, 25% dos pacientes tiveram o tratamento suspenso e foram identificados 20 tipos diferentes de reações adversas. O sistema mais afetado foi o dermatológico seguido pelo sistema nervoso central e periférico. A Fig 7 mostra fotos dos pacientes que interromperam o tratamento e ilustra a gravidade dessas reações adversas que são incômodas. (PONTES, *et al* 2010)



Figura 7: Reações adversas ao benznidazol que levaram suspensão do tratamento: A) Paciente do sexo feminino 38 anos de idade apresentou placas eritematosas no 15º dia de tratamento. B) Paciente do sexo masculino 46 anos de idade apresentou dermatite exfoliativa no 10º dia de tratamento. C) Paciente do sexo feminino 32 anos de idade apresentou erupção cutânea no 25º dia de tratamento. D) Paciente do sexo masculino 46 anos de idade apresentou edema nas extremidades com bolhas no 10º dia de tratamento.

Fonte: PONTES et al, 2010

Após verificar a severidade e o desconforto dos pacientes durante o tratamento, esse estudo vem como alternativa para a melhora da terapêutica e da adesão dos pacientes. Neste trabalho os copolímeros estudados servirão de matriz para a incorporação do fármaco benznidazol e liberação controlada.

3.5 Liberação modificada do Benznidazol

Devido à baixa solubilidade e alta toxicidade do Benznidazol, diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de minimizar esses problemas e melhorar a terapia. Um grande problema em se buscar sistemas de liberação modificada está no fato da Doença de Chagas ser uma doença negligenciada, e com isso há pouquíssimo investimento no tratamento e prevenção dela. A modificação do medicamento que já existe e pesquisa de novos fármacos é algo de alto custo e que se torna dificultado devido ao baixo investimento.

Uma alternativa encontrada para diminuir a toxicidade do fármaco nesses estudos é o uso de polímeros de baixa toxicidade e que sejam hidrofílicos, como o PVP, que é utilizado para melhorar o grau de dissolução de fármacos de baixa solubilidade.

Outro estudo utiliza uma nova formulação farmacêutica a partir da matriz de HPMC (Hidroxipropilmetilcelulose) como forma de promover uma liberação controlada a partir da erosão dessa matriz, tendo obtido bons resultados nos testes de controle de qualidade físico químicos, conseguindo retardar a liberação em 12 horas. (SANTOS, 2011) (ALVES, 2016)

METODOLOGIA

1. Materiais Utilizados

Balão volumétrico, béquer, espátula, balança analítica, provetas, termômetro, cubeta de quartzo, agitador magnético, condensador, aquecedor magnético, estufa. Poli(vinil álcool) (PVA), água MiliQ, água destilada, anidrido acético P.A, ácido acético P.A, ácido clorídrico P.A, ácido sulfúrico P.A, hidróxido de sódio P.A, iodeto de etila P.A, cloreto de sódio P.A, sulfato de magnésio anidro, clorofórmio P.A, diclorometano P.A, metanol P.A, acetona P.A, metacrilato de metila, polietilenoglicol 4000, peróxido de benzoíla, benznidazol comprimidos.

2. Síntese dos copolímeros (ROSA, 2014)

2.1 Síntese do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP)

Em um balão de fundo redondo de 250,00mL foram adicionados 5,00 gramas de polietilenoglicol 4000 (PEG4000) e dissolvidos em 12,5mL de diclorometano. Adicionou-se, posteriormente, 0,35mL de metacrilato de metila (MMA) e $6,25 \times 10^{-3}$ gramas de peróxido de benzoíla como iniciador. A reação ocorreu por seis horas em banho de óleo a 80°C, sob refluxo e agitação magnética. O conteúdo foi transferido para um béquer de 50,00mL e o diclorometano foi evaporado na estufa a 40°C, obtendo um sólido seco Fig 8.

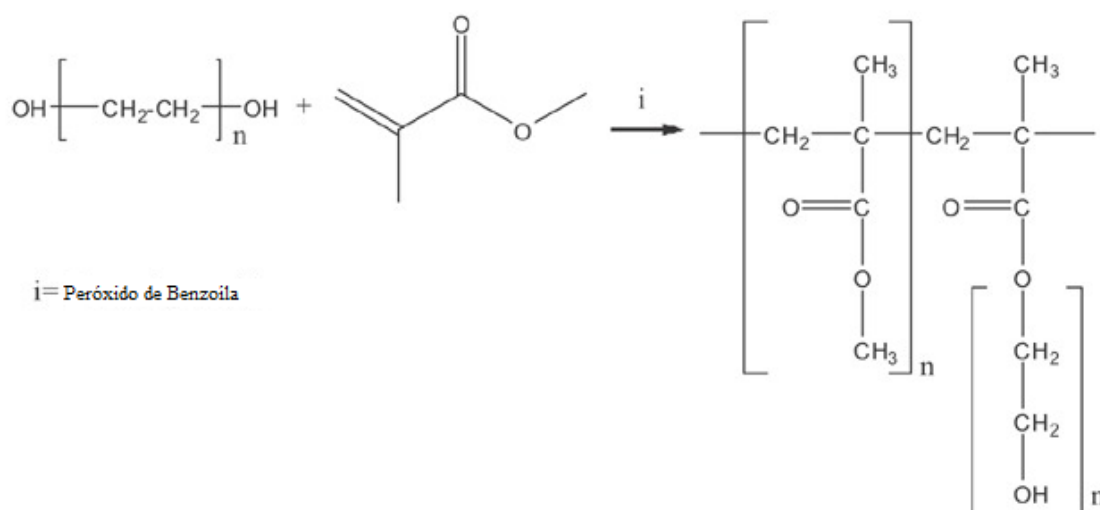


Figura 8: Síntese do copolímero Fonte: ROSA, 2014

2.2 Acetilação do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP ACET)

Em um balão de fundo redondo de 250,00 mL foram adicionados 2,00g do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e 10,00mL de diclorometano. Em outro béquer preparou-se uma solução

de 5,00mL de anidrido acético em 5,00mL de ácido acético, que foi adicionado ao balão contendo o copolímero solubilizado em diclorometano. A mistura reacional foi aquecida em um sistema de refluxo em banho-maria por 30 minutos. Ao término da reação, a mistura foi vertida em um béquer com 100,00mL de água gelada. O copolímero modificado solidificou e o mesmo foi separado por filtração simples. A fase orgânica foi recolhida e após a evaporação do solvente, foi obtido um sólido seco em forma de filme Fig 9.

2.3 Esterificação seguida de hidrólise do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP EST)

Em um balão de fundo redondo de 250,00 mL foram adicionados 2,00 g do copolímero e 10,00 mL de diclorometano. Em um béquer foi preparada uma mistura com 0,10mL de ácido sulfúrico concentrado e 7,00mL de ácido acético. Essa mistura foi adicionada ao balão contendo o copolímero solubilizado em diclorometano que foi colocado em um sistema de refluxo e banho-maria a 40°C por 65 minutos. Depois de esfriar o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação e foram adicionados 10,00mL de água. A fase orgânica foi recolhida e colocada na estufa para secar a 40°C. Foi obtido um produto sólido e seco Fig 9.

2.4 Etilação do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP ETI)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,00 g do copolímero, 10,00 mL de hidróxido de sódio dissolvido em igual volume de água destilada e 10,00 mL de diclorometano. O balão foi aquecido em banho de óleo com agitação magnética e refluxo por 45 minutos. Foi adicionado 2,40 mL de iodeto de etila e a mistura reacional foi mantida sob refluxo e na temperatura de 40°C por 4 horas. Ao final da reação, a mistura foi transferida para um funil de separação e foram adicionados 10,00mL de água, 20,00mL de diclorometano e 10,00mL de NaCl saturado para a separação de fases. A fase orgânica foi coletada, tratada com MgSO₄ anidro, filtrada e colocada na estufa para secar a 40°C. Foi obtido um produto sólido seco Fig 9.

2.5 Halogenação do copolímero PMMA-g-PEG 4000 (COP HAL)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,00g do copolímero, 10mL de diclorometano e 0,50mL de HCl a mistura. O sistema foi aquecido em sistema de refluxo e banho-maria por 40 minutos. Em seguida, a mistura foi vertida em um funil de separação para que a fase orgânica pudesse ser separada da aquosa. Após a separação de fases foi adicionado 5,00mL de NaHCO₃ 5%. A fase orgânica foi recolhida e o resíduo de solvente foi evaporado em estufa a 40°C, obtendo um produto sólido seco Fig 9.

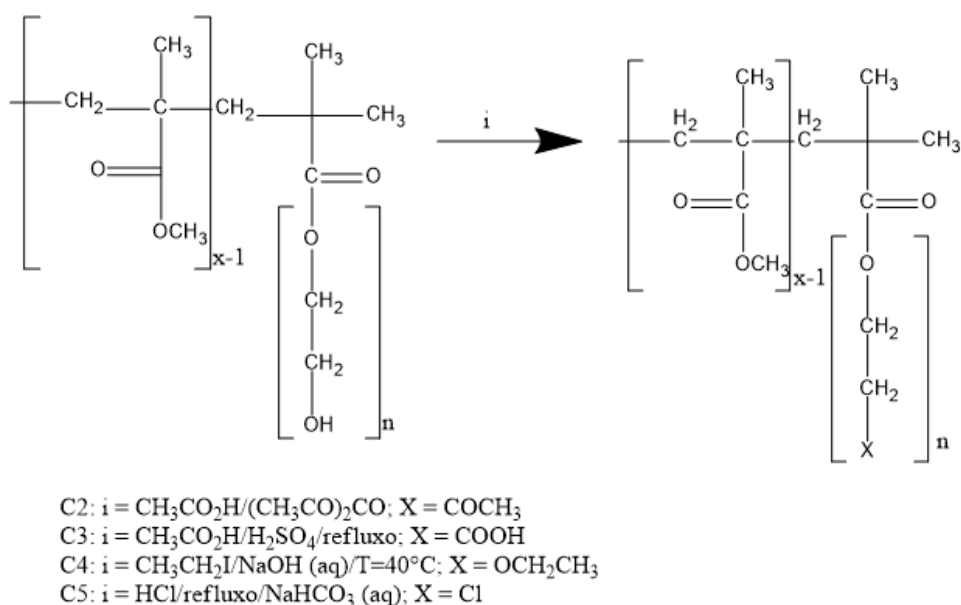


Figura 9: Síntese dos derivados do copolímero Fonte: Adaptado de ROSA, 2014

3. Extração do Benznidazol

O Benznidazol foi extraído a partir de comprimidos do Rochagan, (Roche, Brasil). A extração do fármaco foi feita mediante adaptação do método descrito na Farmacopeia Brasileira, 4ª edição. Foram pulverizados 5 comprimidos e solubilizados em metanol (MeOH), sob agitação e ao abrigo da luz durante 20 minutos. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro quantitativo e concentrada em rotavapor. O material resultante foi ser recristalizado a partir da mistura metanol/água. Os cristais foram filtrados sob vácuo e secados em dessecador contendo sílica desidratante. O Benznidazol puro foi armazenado sob abrigo da luz.

4. Teste de Solubilidade

Foi testada a solubilidade do fármaco e de todos os copolímeros em água e em solventes orgânicos polares e apolares como: diclorometano, metanol, dimetilsulfóxido e acetona.

5. Incorporação do Benznidazol aos copolímeros (AZEVEDO, 2018)

Para o processo de incorporação, esquematizado na Fig 10, foram preparadas duas fases: aquosa e orgânica.

Fase aquosa: em uma chapa aquecedora, colocou-se um béquer de 100,00mL contendo aproximadamente 40,00mL de água e quando esta atingiu a temperatura de aproximadamente 70°C, adicionou-se lentamente 0,12 gramas de polivinil álcool (PVA), sob agitação, até completa dissolução.

Fase orgânica: em outra chapa aquecedora, colocou-se aproximadamente 6,00mL de acetona em um béquer de 25,00mL. Quando o solvente alcançou a temperatura de aproximadamente 30°C, foram adicionados 0,3 gramas do copolímero e 0,10 gramas de benznidazol. Esse sistema foi mantido sob agitação até completa dissolução.

Após o preparo das duas fases, a fase aquosa foi vertida sobre a fase orgânica. A mistura foi submetida à agitação magnética, por quatro horas a uma temperatura de 35°C, sob refluxo. Em seguida, o produto foi levado à estufa a 40°C para evaporação.



Figura 10: Incorporação do Benznidazol nos copolímeros

O processo de incorporação do benznidazol em cada copolímero é semelhante, de forma que ocorre mudança apenas na fase orgânica, substituindo-se o copolímero em que se deseja incorporar o fármaco, nas mesmas condições de reação e proporções dos reagentes e precursores. Assim, essa reação foi reproduzida cinco vezes, com os diferentes copolímeros modificados e com o copolímero sem modificação, resultando nos copolímeros incorporados com o benznidazol: copolímero incorporado com benznidazol (COP BZ), copolímero acetilado incorporado com benznidazol (COP ACET BZ), copolímero esterificado incorporado com benznidazol (COP EST BZ), copolímero etilado incorporado com

benznidazol (COP ETI BZ) e copolímero halogenado incorporado com benznidazol (COP HAL BZ).

6. Ensaio de eficiência de incorporação

Após a realização da reação de incorporação do fármaco com os copolímeros, o produto final foi pesado e anotado valor obtido individualmente. Foram separados 5 béqueres e identificados com os nomes dos polímeros correspondentes. Em cada béquer foi colocado o copolímero incorporado correspondente e 100,0mL de metanol para a extração do fármaco. Os béqueres foram deixados sob agitação magnética por 2 horas, sem aquecimento, em repouso e em sistema fechado na bancada por 72 horas. Ao fim das 72 horas foram pesados 5 balões de fundo redondo de 250 mL e 5 papéis de filtro vazios., ambos foram identificados com o nome do copolímero correspondente e seus pesos foram anotados. A solução, que continha o copolímero incorporado insolúvel e o fármaco solubilizado em metanol, foi filtrada por filtração simples para o balão correspondente. O solvente metanol, presente no filtrado contendo o benznidazol solubilizado, foi evaporado em rotavapor e o papel de filtro com o copolímero retido foi colocado em estufa para secar. O balão contendo o benznidazol e o papel de filtro contendo o copolímero após a total evaporação do solvente foram pesados e seus pesos anotados.

7. Solução Tampão

Para a metodologia de liberação foram utilizadas duas soluções tampão de pH 7,3 e 3,0 que correspondem respectivamente ao pH do sangue e do estômago. A escolha desses valores se baseia no caminho a ser percorrido pelo medicamento ao entrar em contato com o corpo humano.

7.1 Tampão de pH 3,0

Para o preparo da solução foi pesado 120,0g de acetato de sódio, transferido para um béquer (béquer 1) e solubilizado em 200mL de Água MiliQ. Em outro béquer (béquer 2) foi adicionado 100,0mL de Água MiliQ e vertido 60,0mL de ácido acético. O béquer 2 foi vertido sobre o béquer 1, e o volume da solução foi completado para 1000,00mL. A solução foi armazenada em recipiente de vidro âmbar, identificada e estocada em geladeira. O pH foi aferido em pHmetro.

7.2 Tampão de pH 7,3

Para o preparo dessa solução em um béquer foram solubilizados 6,8g de KH_2PO_4 em 250mL de Água MiliQ. Em outro béquer foram solubilizados 1,4g de NaOH em 175mL de Água MiliQ. Após a solubilização de ambos eles foram misturados e o volume completado com água MiliQ até 1000mL. A solução foi vertida em um recipiente de vidro âmbar, identificado e estocado em geladeira. O pH foi aferido em pHmetro.

8. Curva Padrão

A curva padrão foi realizada com o preparo de soluções contendo o copolímero modificado incorporado com o Benznidazol e as soluções tampão de pH descrito em concentrações crescentes (0,1mg/mL, 0,2mg/mL, 0,4mg/mL, 0,6mg/mL e 0,8mg/mL) em balões volumétricos de 10mL. Cada solução foi analisada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 316nm que correspondente a absorção máxima do benznidazol (FB 6ª edição).

9. Liberação Controlada

Para a liberação controlada foram feitas leituras de absorbâncias no espectrofotômetro de UV e o comprimento de onda utilizado foi 316nm, pois na varredura de 200-800 nm e após pesquisa bibliográfica verificou-se que o benznidazol apresenta absorbância máxima em 316nm. As soluções de liberação foram preparadas em balões de 25mL com concentrações variando de 0,1 mg/mL a 0,4 mg/mL. Durante o tempo de liberação as soluções foram mantidas em estufa à 36,5°C com agitação. Foram feitas leituras começando no tempo 0 (zero) até 72 (setenta e duas) horas, sendo que nas primeiras 4 horas foram lidas alíquotas a cada 30 minutos e posteriormente a cada 12 horas. Dessa forma, as soluções de cada copolímero foram preparadas separadamente e com cada tampão, gerando assim 10 soluções de liberação.

10. Ensaio de Viabilidade Celular

Sulforodamina B

As células (fibroblastos humanos MRC-5) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma®) contendo 10,0% de soro fetal bovino (Vitrocell®) e gentamicina (60 µg/L). As culturas foram incubadas em estufa a 37°C com 5,0% de CO₂.

Para realização dos experimentos, após atingirem de 80,0 a 90,0% de confluência, o meio de cultura foi descartado e as células foram desprendidas do frasco de cultura celular por raspagem com suporte plástico (cell scraper). Em seguida foram adicionados 10 mL de tampão PBS pH 7,2 acrescido de 1,0% de solução EDTA 200 mM. O PBS contendo as células foi então transferido para um tubo Falcon esterilizado e centrifugado a 1300 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado, meio RPMI foi adicionado para ressuspender as células. A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer.

As amostras foram solubilizadas em meio RPMI contendo 2,0% de DMSO nas concentrações de (4,00 a 0,06 mg/mL). As células (5 x 10⁴ células por poço) foram adicionadas em placas de 96 poços para cultivo celular e incubadas por 24 horas para adesão. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 100 µL das amostras nas diferentes concentrações. Como controles foram incluídas células somente com RPMI e com RPMI contendo DMSO 2,0%.

Após adição das amostras, as placas foram incubadas por 24h e foi determinada a viabilidade celular pelo método de sulforodamina B (SRB) (SKEHAN et al. 1990). O meio foi removido e os poços cuidadosamente lavados duas vezes com PBS pH 7,2. As células foram então fixadas por adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 20% frio durante 1 h a 4 °C. Após este tempo, a placa foi lavada com água destilada e seca. Posteriormente, as células fixadas foram coradas durante 30 min com 30 µL de SRB 0,1% dissolvido em ácido acético a 1,0%. A placa foi então lavada com ácido acético a 1,0%, novamente deixada secar e adicionados 200 µL de tampão Tris 10 mM (pH 10,5) para solubilizar a coloração. Depois de aproximadamente 30 min a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida em leitor de microplacas (490 nm) e os valores expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle. A concentração citotóxica para 50,0% das células foi calculada no GraphPad Prism 5.0 software através de regressão não linear.

11. Caracterizações

11.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas nos equipamentos da marca Jeol, modelo JSM- 6510, do laboratório de Microscopia e Microanálises do

DEGEO/EM – Laboratório integrante da RMic, Rede de Microscopia e Microanálises de Minas Gerais – FAPEMIG e no molelo Vega 3 – Tescan, vaporizados pelo Quorum Q150R ESdo laboratório NanoLab da Escola de Minas vinculado a REDEMAT.

11.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

As análises de Infravermelho (FTIR) foram realizadas com Thermo Scientific Nicolet 380 FT-IR, região de alta frequência (4000 a 600 cm^{-1}).

11.3 Microscopia de Força atômica (FM)

As amostras para análise de Força Atômica (FM), foram preparadas através do método Spread Coating usando 0,6 mg/mL copolímero com o fármaco incorporado em solução de acetona aquecida, que foi seca após 30s por um fluxo de nitrogênio

11.4 Difração de Raio X (DRX)

Foi utilizado o difratômetro de raios X, modelo X'Pert3 Powder da marca PANalytical equipado com tubo de cobre, com radiação Cu-K α de comprimento de onda igual a 1,5406 Å, na condição de varredura em arranjo 2 teta no intervalo de de 5 a 90°, tensão de operação de 45 kV, intensidade de corrente de 40 mA e tempo de coleta igual a 14 minutos, disponível no Laboratório de Microscopia Ótica e Difração de Raios X do DEMIN/UFOP. A obtenção dos difratogramas foi realizada pelo software Data Collector.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Sínteses dos Copolímeros e Incorporações com o fármaco

A Fig. 11 apresenta o aspecto físico dos copolímeros modificados, que são partículas sólidas, em sua maioria de cor branca.



Figura 11: Aspectos físicos dos copolímeros antes da incorporação. Respostivamente COP, COP ACET, COP EST, COP ETI e COP HAL

A Fig 12 mostra os aspectos físicos dos copolímeros após a incorporação com o fármaco benznidazol. É possível visualizar que a maioria apresentou aspecto uniforme de filme e que foi diferente do copolímero de origem, este resultado é uma pré indicação de que houve incorporação, todos os copolímeros apresentaram coloração branca e não aparentaram ser quebradiços.

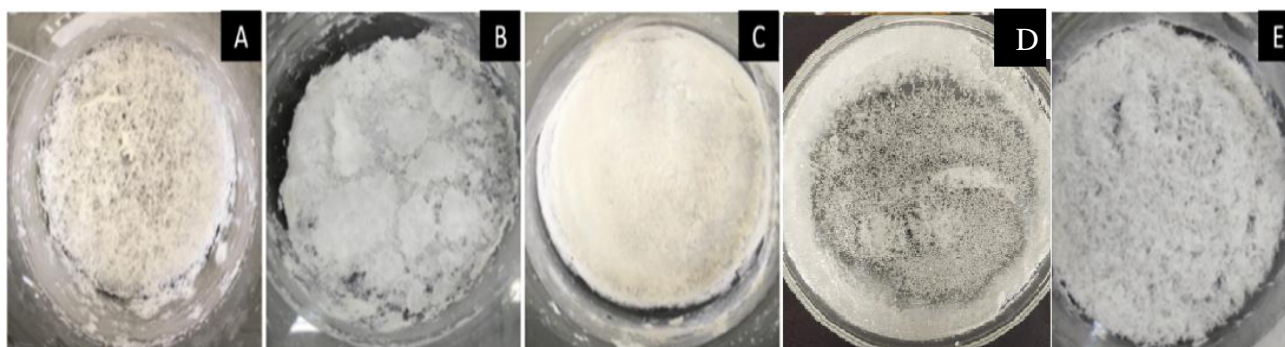


Figura 12: Aspecto físico dos copolímeros incorporados: COP BZ (A), COP ACET BZ (B), COP EST BZ (C), COP ETI BZ (D), COP HAL BZ (E).

2. Teste de Solubilidade

A Tabela 2 apresenta a solubilidade dos copolímeros e do benznidazol em diferentes solventes orgânicos (DMSO, acetona, diclorometano e metanol) e em diferentes temperaturas. Todos os copolímeros foram insolúveis em DMSO e em metanol tanto em temperatura ambiente quanto a quente. Já com a acetona, todos foram insolúveis em temperatura ambiente e solúveis no

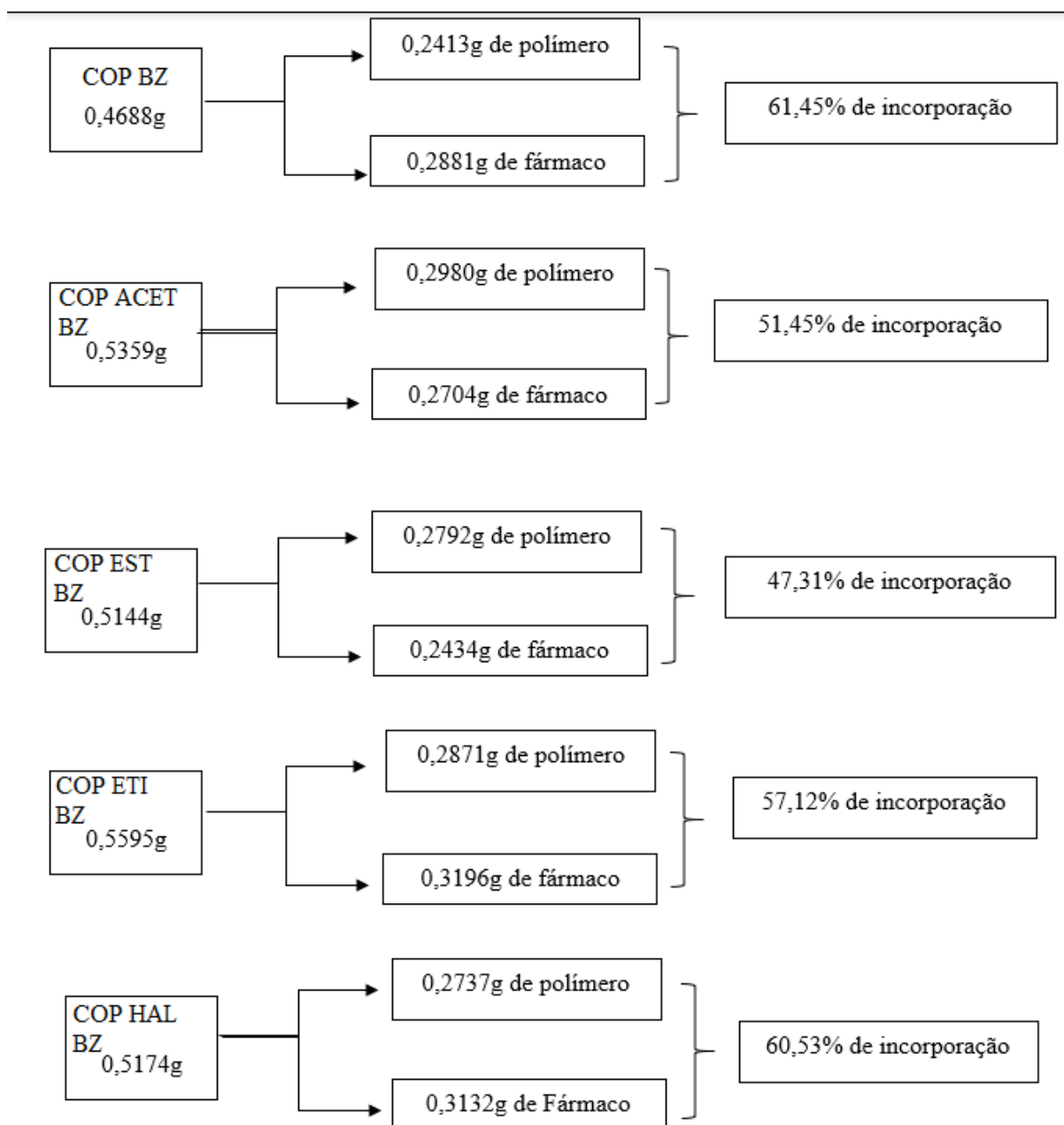
solvente a quente. Os copolímeros só foram solúveis na temperatura ambiente e à quente com diclorometano. O fármaco foi solúvel em todos os solventes e em ambas temperaturas, com exceção da solubilidade em diclorometano. Através dos resultados do teste de solubilidade, que foram escolhidos os solventes utilizados nas reações. Para a extração do fármaco usou-se metanol, uma vez que o mesmo solubiliza totalmente o benznidazol, mas não o copolímero e para a incorporação foi utilizada a acetona a quente, pois solubiliza ambos.

Tabela 2: Solubilidade dos copolímeros e do fármaco em diferentes solventes orgânicos

| Copolímero | Acetona | | DMSO | | Diclorometano | | Metanol | |
|-------------|---------|----|------|----|---------------|----|---------|----|
| | T1 | T2 | T 1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 |
| C1 | - | + | - | - | + | + | - | - |
| C2 | - | + | - | - | + | + | - | - |
| C3 | - | + | - | - | + | + | - | - |
| C4 | - | + | - | - | + | + | - | - |
| C5 | - | + | - | - | + | + | - | - |
| C6 | - | + | - | - | + | + | - | - |
| Benznidazol | + | + | + | + | - | - | + | + |

T1= Temperatura ambiente; T2=Temperatura a quente, temperatura de ebulição do solvente; - insolúvel; + = solúvel

3. Eficiência de Incorporação



A partir do esquema apresentado é possível inferir que o COP BZ obteve maior eficiência na incorporação, com 61,45% de fármaco e o COP EST BZ obteve a menor eficiência na incorporação com 47,31%. Como é possível perceber nos dados apresentados, a massa de fármaco encontrada após o ensaio de eficiência é maior do que a massa utilizada para a reação. Acredita-se que essa massa a mais seja relativa ao solvente utilizado, metanol, e que há um aprisionamento do mesmo em meio ao fármaco, dificultando sua evaporação. Com isso torna-se difícil a interpretação dos dados obtidos e a afirmação de qual copolímero apresentou melhor eficiência de incorporação.

4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Fig 13 apresenta as fotomicrografias do copolímero PMMA-g-PEG 4000 antes da incorporação do fármaco em 100, 50 e 10 μ m. É possível visualizar o aspecto da superfície do polímero, sendo ela irregular, áspera formada por partículas com aspecto de cristal e de tamanho grande.

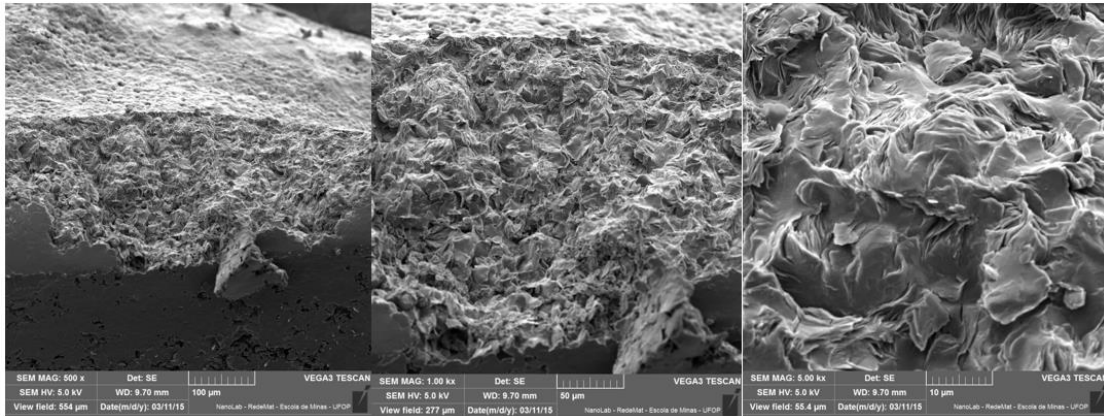


Figura 13: Fotomicrografias do copolímero PMMA-g-PEG 4000 em 100, 50 e 10 μ m

Na Fig 14 têm-se as fotomicrografias dos copolímeros antes da incorporação do fármaco e nelas é possível visualizar que o aspecto da superfície se mantém, com exceção do COP HAL que tem uma superfície mais homogênea e lisa.

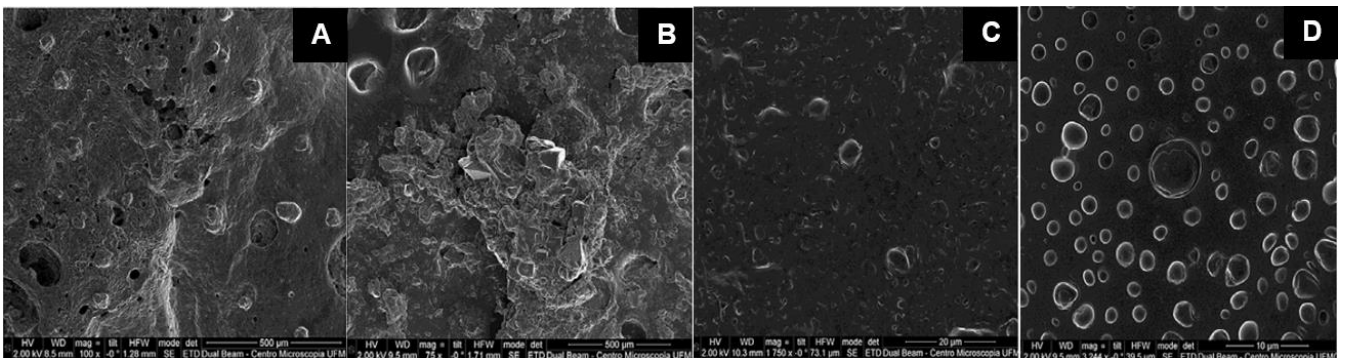


Figura 14: Fotomicrografias dos copolímeros COP ACET em 100 μ m (A), COP EST em 100 μ m (B), COP ETI em 20 μ m (C) e COP HAL em 10 μ m (D) respectivamente

Na Fig 15 têm-se a fotomicrografia do fármaco (A), que apresenta suas partículas em formato de agulha e aparenta ser um cristal. Nas fotomicrografias dos copolímeros incorporados observa-se a formação das microsferas, que são responsáveis pela incorporação do fármaco e sua posterior entrega no local de ação. A presença das mesmas indica se foi efetiva ou não a reação de incorporação, uma vez que elas são os sistemas que irão carrear o fármaco dentro do organismo. É possível visualizar que em todos os copolímeros foram formadas

microesferas, com destaque para o COP EST BZ (E) que visualmente apresentou uma quantidade maior em relação aos outros.

Além disso, destaca-se a imagem D, referente ao COP EST BZ, na qual não é possível visualizar nenhuma microesfera na amostra analisada. Apesar disso, a superfície da amostra após a incorporação se alterou quando comparada à imagem 14, indicando que apesar da não visualização das microesferas, o fármaco exerceu influência

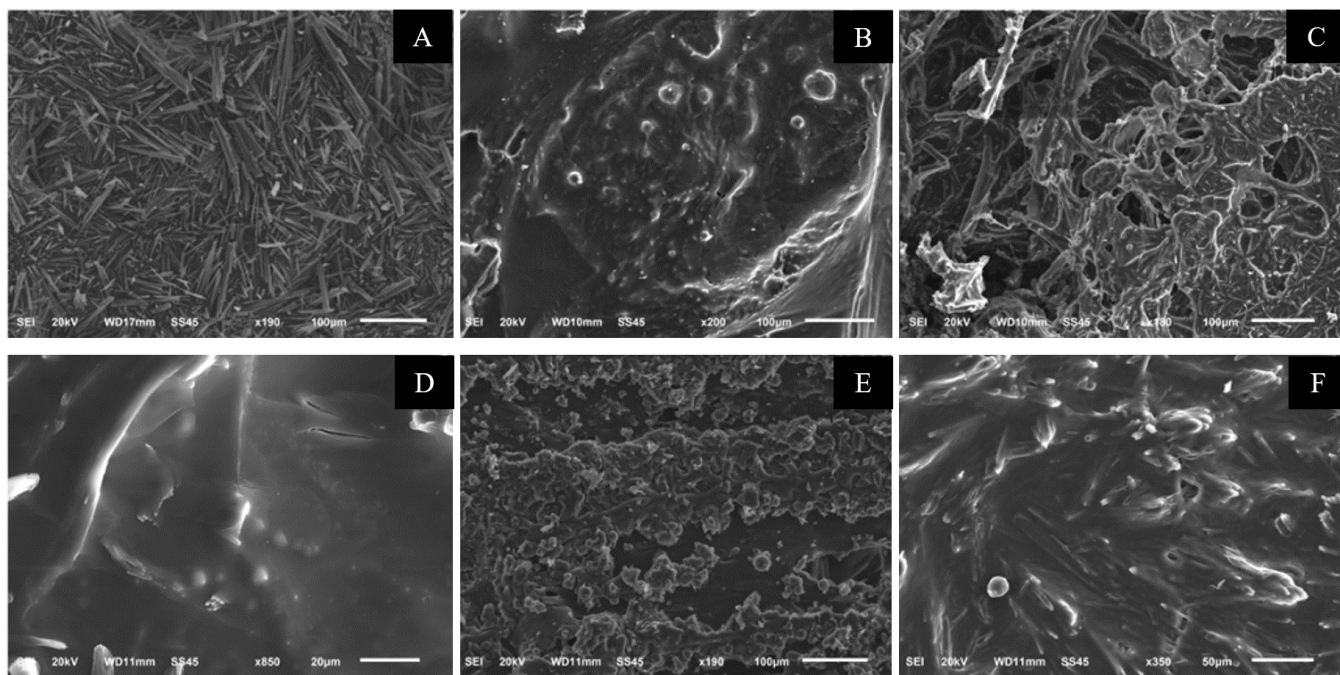


Figura 15: Fotomicrografias do Benznidazol (A), COP BZ (B), COP ACET BZ (C), COP EST BZ (D), COP ETI BZ (E) e COP HAL BZ (F).

5. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Na Fig 16 tem-se o espectro de infravermelho do fármaco utilizado no estudo, o benznidazol. Destaca-se como bandas características para a identificação do fármaco as seguintes: estiramento de N-H em 3266 cm^{-1} , as três bandas referentes ao estiramento de C=C do anel em torno de 1400, 1500 e 1600 cm^{-1} e o estiramento de C-H do anel aromático em 3030 cm^{-1} , assim como em 1355 cm^{-1} a vibração do estiramento simétrico do grupo nitro.

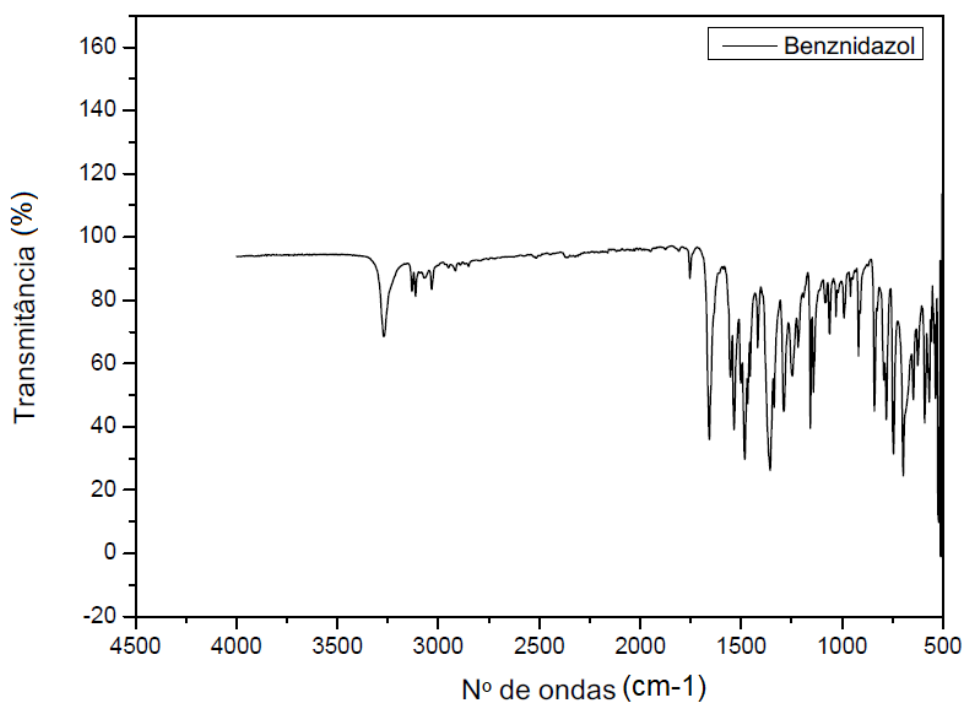


Figura 16: Espectro de infravermelho do fármaco Benznidazol

Nas Fig 17 à Fig 21 estão representadas as análises de infravermelho do fármaco, dos copolímeros e dos copolímeros incorporados de forma comparativa na mesma imagem. Essa análise permite caracterizar a substância presente na amostra e com isso comprovar a ocorrência da incorporação e da modificação, baseado nos grupos funcionais que foram identificados. A partir destas figuras pode-se comparar a efetividade da modificação da cadeia polimérica ao ver a mudança do perfil do espectro do copolímero modificado em relação ao copolímero puro, com presença em cada um deles de bandas correspondentes ao grupo inserido. Além disso, é possível ver a mudança do perfil do espectro após a incorporação com fármaco, com presença de bandas que são características do mesmo, comprovando a efetividade da reação de incorporação.

Podem ser visualizadas as seguintes bandas de absorção: C=O de éster em 1750 cm^{-1} para o copolímero acetilado (COP ACET) na Fig 21, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ de éter assimétrico em 1100 e 1250 cm^{-1} referente ao copolímero etilado (COP ETI) na Fig 19, C=O referente à carbonila do ácido carboxílico em 1700 cm^{-1} e uma banda larga entre 2900 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} de OH referente ao ácido carboxílico que caracteriza o copolímero esterificado seguido de hidrólise (COP EST) na Fig 18, e Cl em 750 cm^{-1} para o copolímero halogenado (COP HAL) na Fig 20.

Em relação às incorporações é possível visualizar as bandas referentes ao copolímero de origem e as bandas que são específicas do fármaco. Há uma diferença quanto a intensidade da banda após a incorporação com o fármaco que varia de acordo com cada copolímero modificado. Isso demonstra que a interação e a força da mesma entre o fármaco e o polímero varia, uma vez que cada modificação vai promover um tipo de interação. Não é interessante que essa interação seja muito forte, uma vez que a matriz precisa liberar o fármaco posteriormente no organismo para que o mesmo exerça sua atividade. (PAVIA, *et al*, 2015)

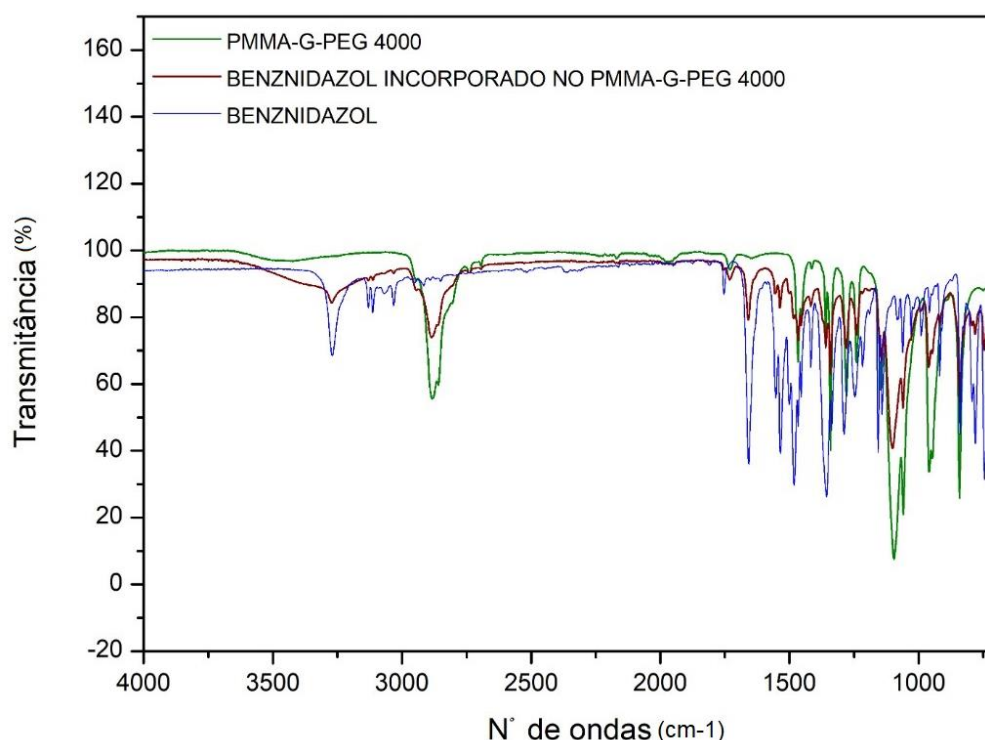


Figura 17: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), Benznidazol incorporado ao PMMA-g-PEG 4000 (COP BZ) e Benznidazol

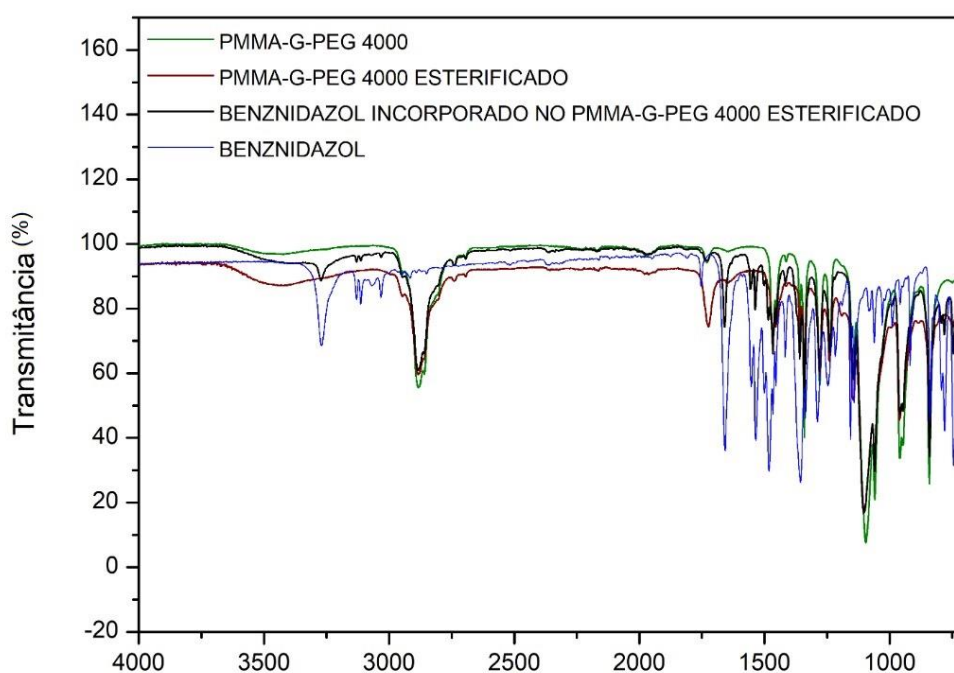


Figura 18: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Esterificado (COP EST), PMMA-g-PEG 4000 Esterificado incorporado (COP EST BZ) e benznidazol

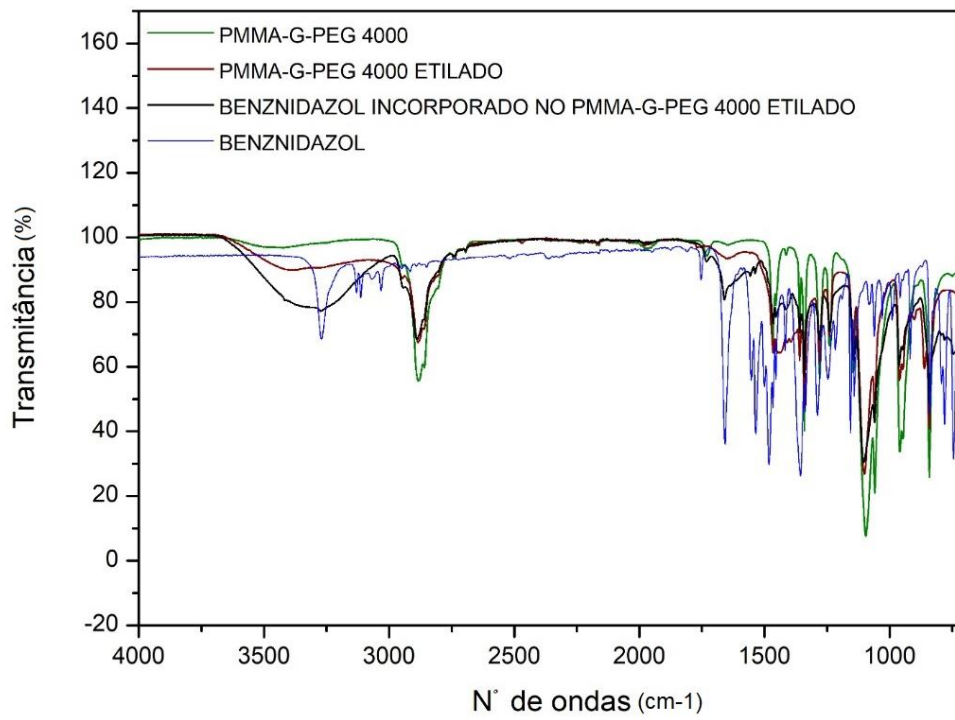


Figura 20: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Etilado (COP ETI), PMMA-g-PEG 4000 Etilado incorporado (COP ETI BZ) e benzimidazol,

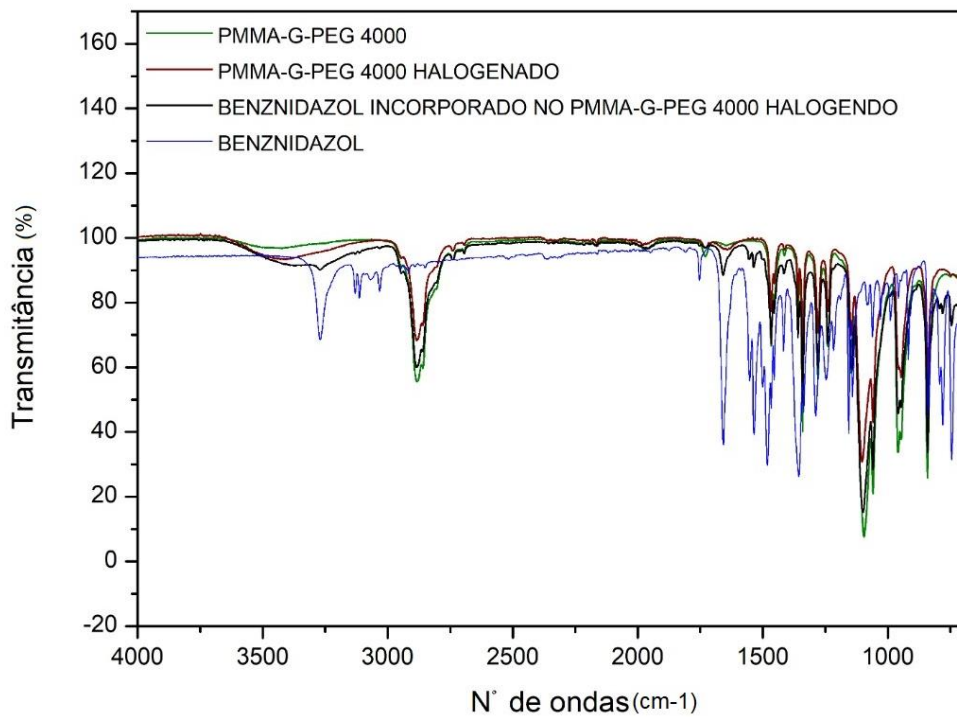


Figura 19: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Halogenado (COP HAL), PMMA-g-PEG 4000 Halogenado Incorporado (COP HAL BZ) e benzimidazol

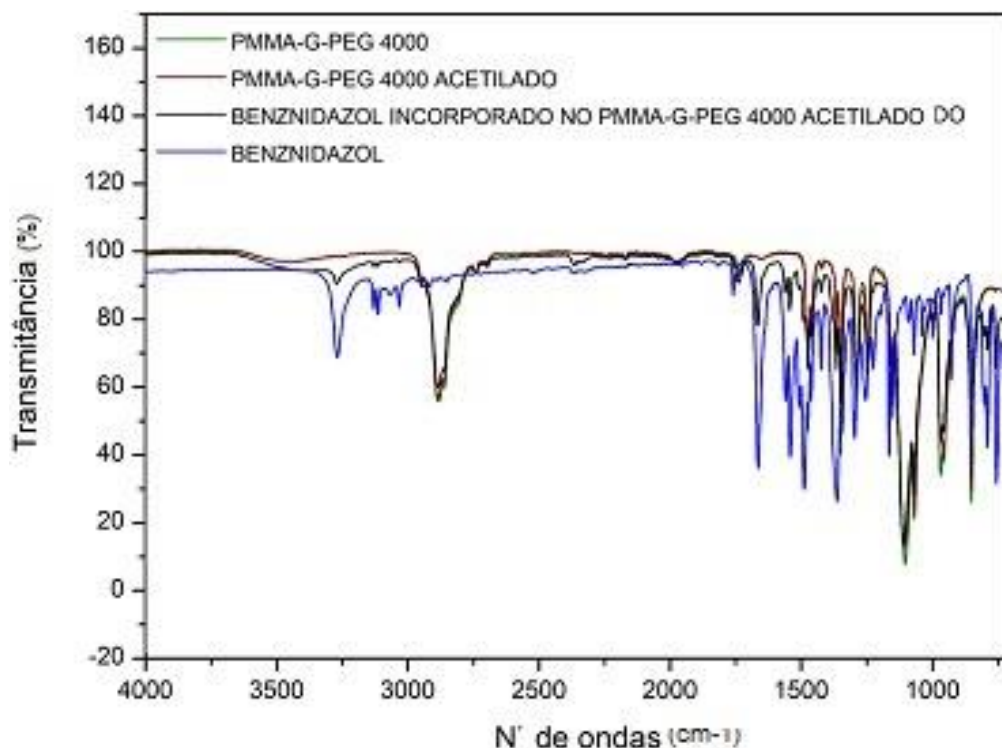


Figura 21: Espectro de infravermelho comparativo entre PMMA-g-PEG 4000 (COP), PMMA-g-PEG 4000 Acetilado (COP ACET), PMMA-g-PEG 4000 Acetilado Incorporado (COP ACET BZ) e benznidazol

6. Microscopia de Força Atômica (FM)

Segundo Teixeira 2008, a FM é uma técnica importante na caracterização morfológica superficial de amostras por apresentar dados relativos a distância, altura e picos. Na Fig 22 têm-se as imagens das análises de microscopia de força atômica, que avalia a morfologia e principalmente a topografia do copolímero, sendo que na escala quanto mais claro mais alto relevo. Na imagem é possível observar as diferenças entre os copolímeros sem o benznidazol e dos copolímeros incorporados com o fármaco. Nas imagens referentes aos copolímeros antes da incorporação percebe-se que a superfície dos mesmos é mais uniforme, poucas alterações na morfologia. Destaca-se ainda as imagens B e D, referentes aos COP ACET e COP ETI respectivamente, que são os únicos que apresentaram pontos mais claros antes da incorporação. Apesar disso, o copolímero etilado tem as esferas em escala de 100nm enquanto o acetilado apresenta essas esferas na escala de 10nm. Já nos copolímeros com o fármaco (F, H e J) observa-se numerosos pontos mais claros que antes da incorporação não existiam, isso indica que após a incorporação houve mudança na morfologia e na topografia do copolímero e que os pontos mais claros indicam um aglomerado de fármaco. Na imagem G, referente ao COP ACET BZ, mostra que após a incorporação os pontos mais claros se aglomeraram e

ainda aumentaram de tamanho, chegando a escala de 20nm, indicando que a incorporação exerceu efeito na topografia do copolímero. Além disso, na imagem I, referente ao COP ETI BZ, tem-se também uma aglomeração dos pontos mais claros apesar da diminuição da escala de relevo, que após a incorporação foi pra 80nm. É importante destacar também o aspecto de esfera das partículas que é visualizado em I, e não foi evidenciado nos outros copolímeros incorporados, com superfície lisa.

A utilização da FM para a visualização da topografia das partículas dos copolímeros e do fármaco se deve ao fato de que essa técnica permite visualizar partículas menores, além de ser possível a visualização das mesmas de forma individualizada. (SILVA, 2015; TEIXEIRA 2008)

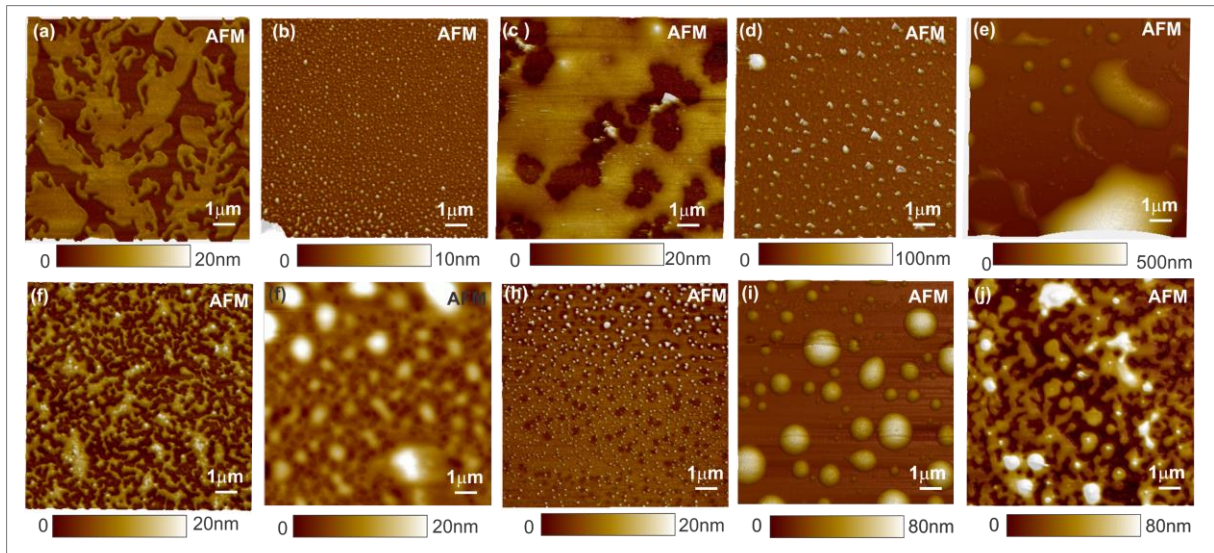


Figura 22: Microscopia de força atômica dos copolímeros. COP (A), COP ACET (B), COP EST (C), COP ETI (D), COP HAL (E), COP BZ (F), COP ACET BZ (G), COP EST BZ (H), COP ETI BZ (I) e COP HAL BZ (J)

7. Difração de Raio X (XRD)

A difração de raio x é uma técnica usada para caracterizar a amostra e avaliar a cristalinidade do material (ALBERS, 2002). Os difratogramas de raio X do copolímero esterificado (COP EST) apresentou uma organização cristalina mais simples, sem apresentar regiões amorfas, presentes nas outras cadeias, características de copolímeros semi-cristalinos. Mas todos apresentaram os picos referentes ao copolímero grafitizado, com um deslocamento dos picos do copolímero etilado (COP ETI). Os picos mais largos observados, em relação aos picos do copolímero grafitizado, demonstra a menor organização dos copolímeros modificados. (Fig.23)

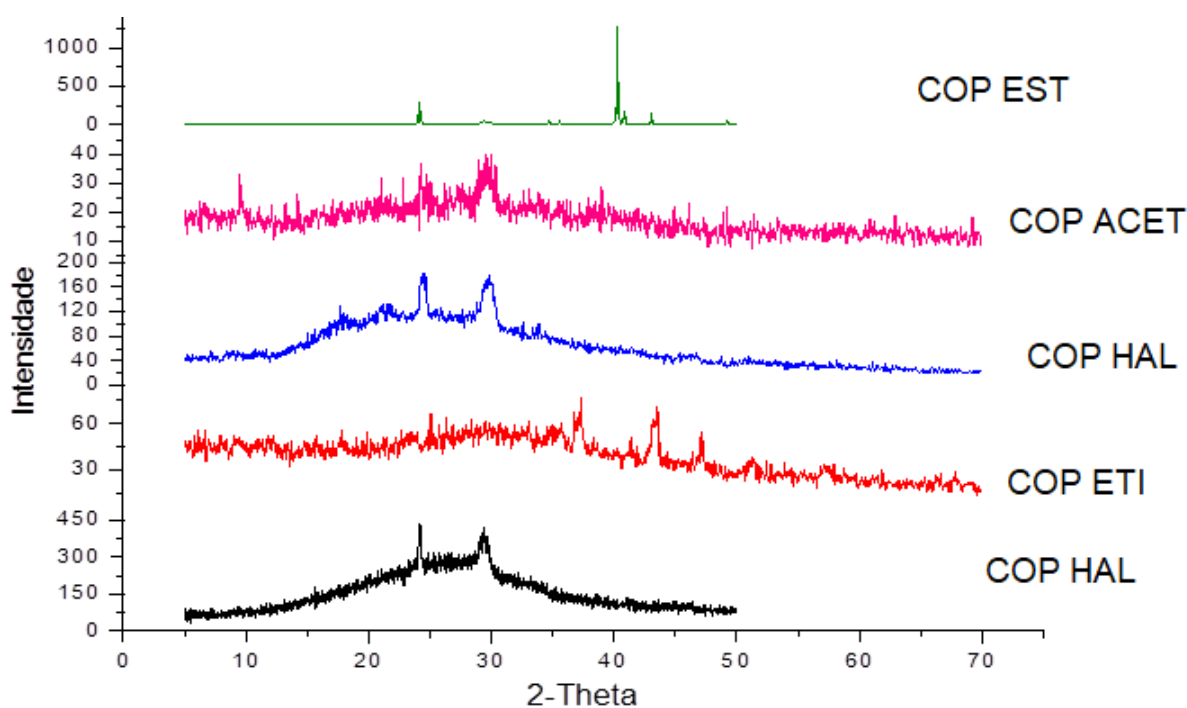


Figura 23: Difratograma de raio X dos copolímeros

Na Fig 24 é possível comparar o comportamento da cristalinidade do polímero e a alteração após a incorporação com o fármaco, com destaque o COP EST BZ e COP ETI BZ que evidenciaram picos relativos ao fármaco e com maior intensidade.

A incorporação do benznidazol aumentou a organização de todas as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, sua cristalinidade. Esse aumento pode estar relacionado ao caráter polar do fármaco inserido e à sua maior interação com os polímeros modificados, cuja polaridade é maior do que a do copolímero grafitizado original, essa modificação é observada devido ao

padrão de deslocamento diferenciado em relação à modificação e os picos mais finos, que demonstram a maior organização.

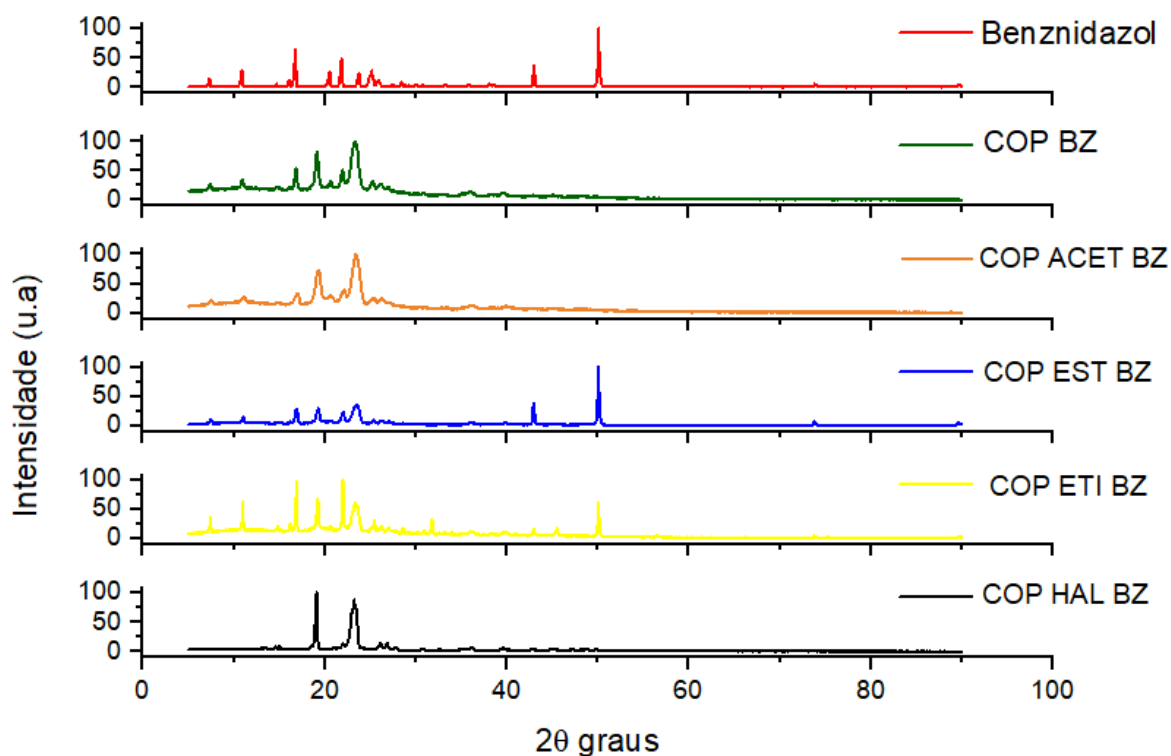


Figura 24: Difratoograma de raio X dos copolímeros incorporados com o fármaco e o benznidazol puro

8. Curva Padrão

Os gráficos abaixo representados na Fig 25, correspondem às curvas padrão obtidas a partir da leitura da absorbância em ultravioleta, no comprimento de onda de 316nm, das amostras diluídas dos quatro copolímeros incorporados com o benznidazol. Todos eles apresentaram valor de R^2 próximo de 1 e conseqüentemente uma tendência linear.

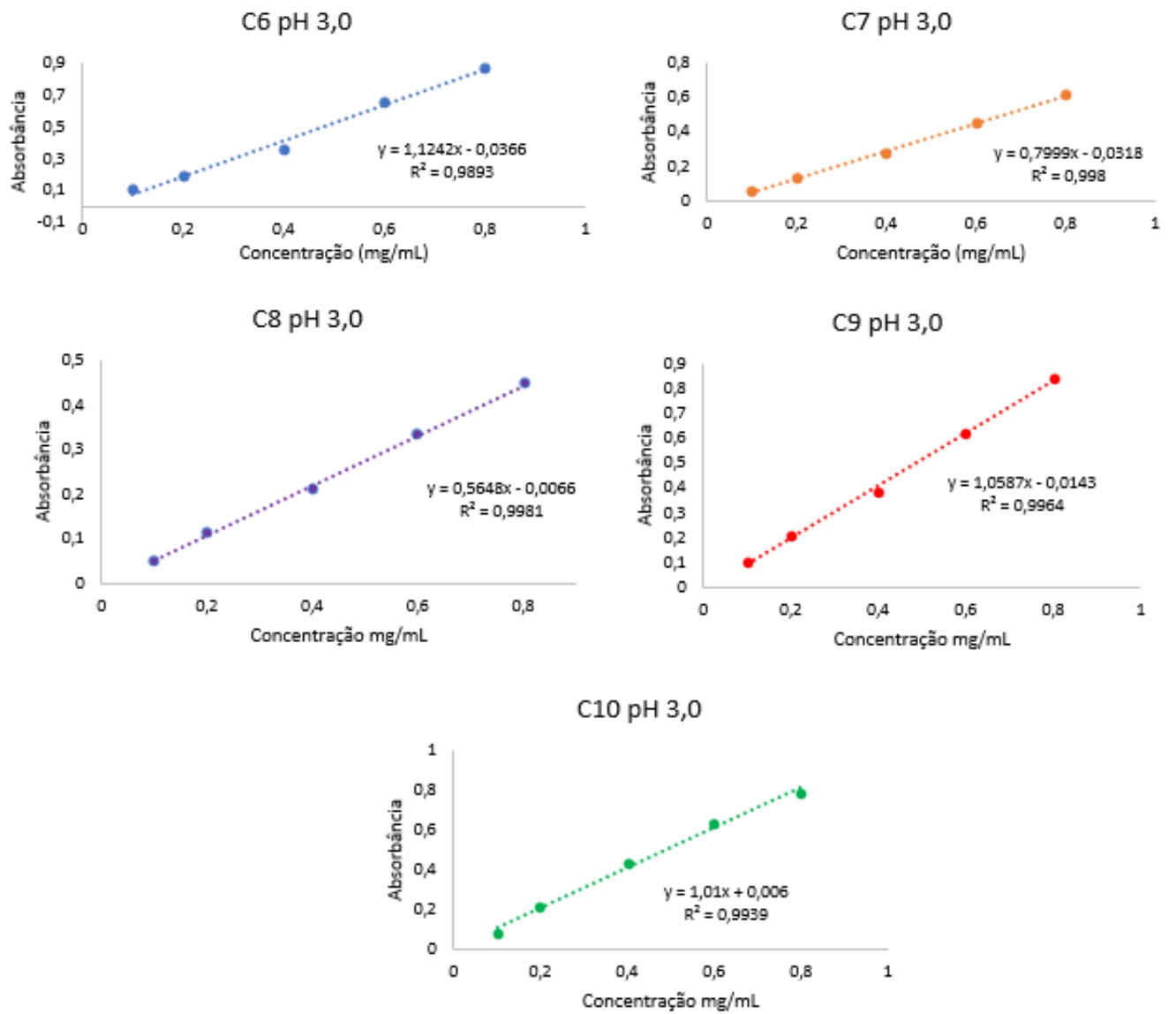


Figura 25: Gráficos de curva padrão dos copolímeros incorporados em pH 3,0

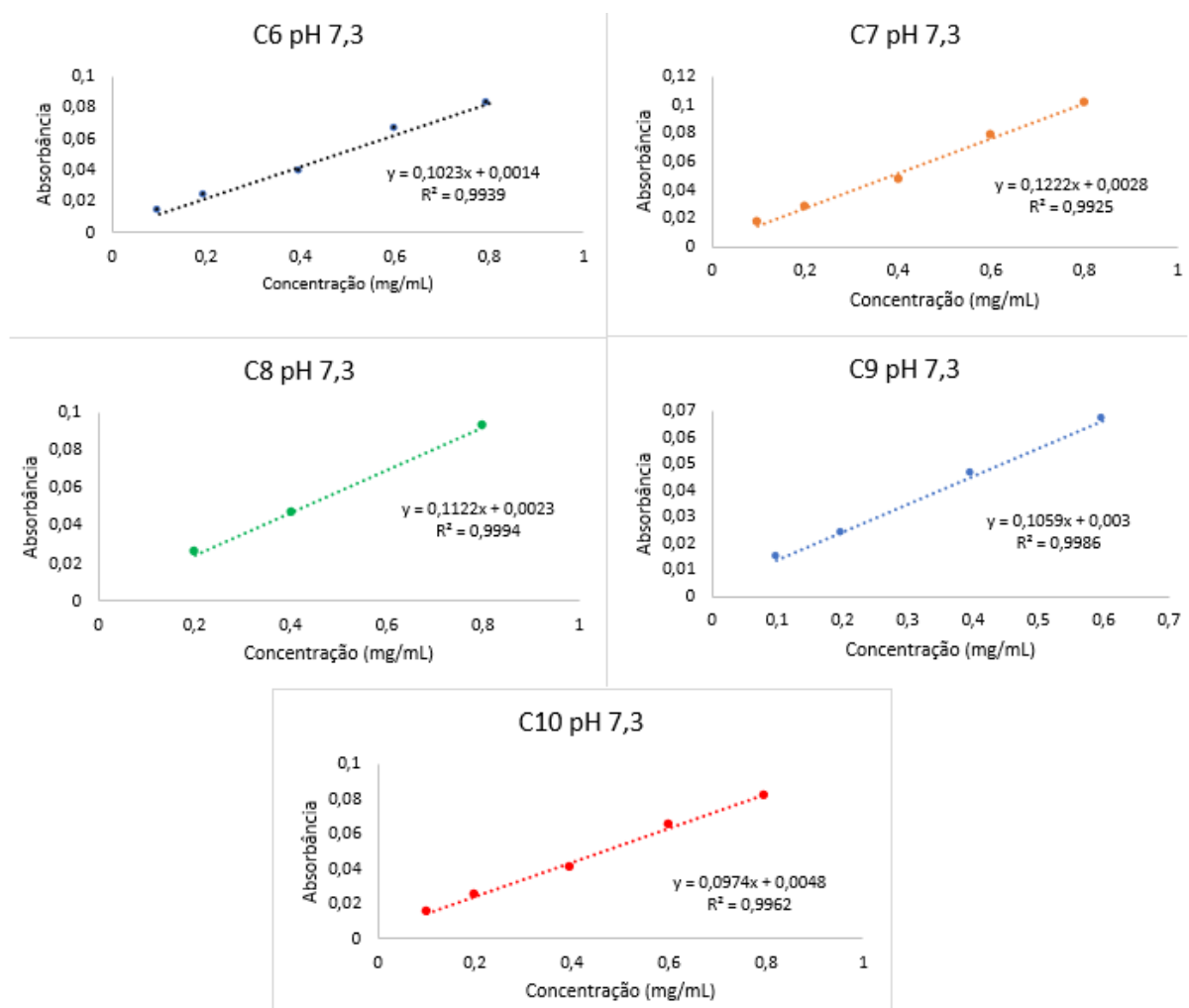


Figura 26: Gráficos de curva padrão dos copolímeros incorporados em pH 7,3

A Fig 26 mostra dos gráficos de curva padrão dos copolímeros incorporados em pH 7,3. Assim como as curvas do pH 3,0 todos apresentaram R^2 próximo de 1 demonstrando a tendência linear esperada para uma curva de calibração.

9. Liberação Controlada

O cálculo da concentração foi feito a partir da absorbância obtida, utilizando os valores da curva de calibração de cada amostra, seguindo a seguinte fórmula:

$$Ca = Aa \times FC$$

Onde, Ca – concentração da amostra

Aa- absorbância da amostra

FC (fator de calibração) – média dos valores de C_p/A_p

A_p – absorvância do padrão

C_p – concentração do padrão

A liberação de um fármaco a partir de uma matriz polimérica depende uma combinação de fatores relacionados à erosão e difusão da mesma. Na Fig 27 é possível comparar os gráficos de liberação controlada dos copolímeros no pH 3,0. A partir dessa comparação pode-se inferir que todos apresentaram perfil de liberação controlada, similar ao ideal preconizado na literatura, ao longo do tempo total estudado e que COP ACET BZ, COP EST BZ e COP HAL BZ tiveram maior concentração de liberação.

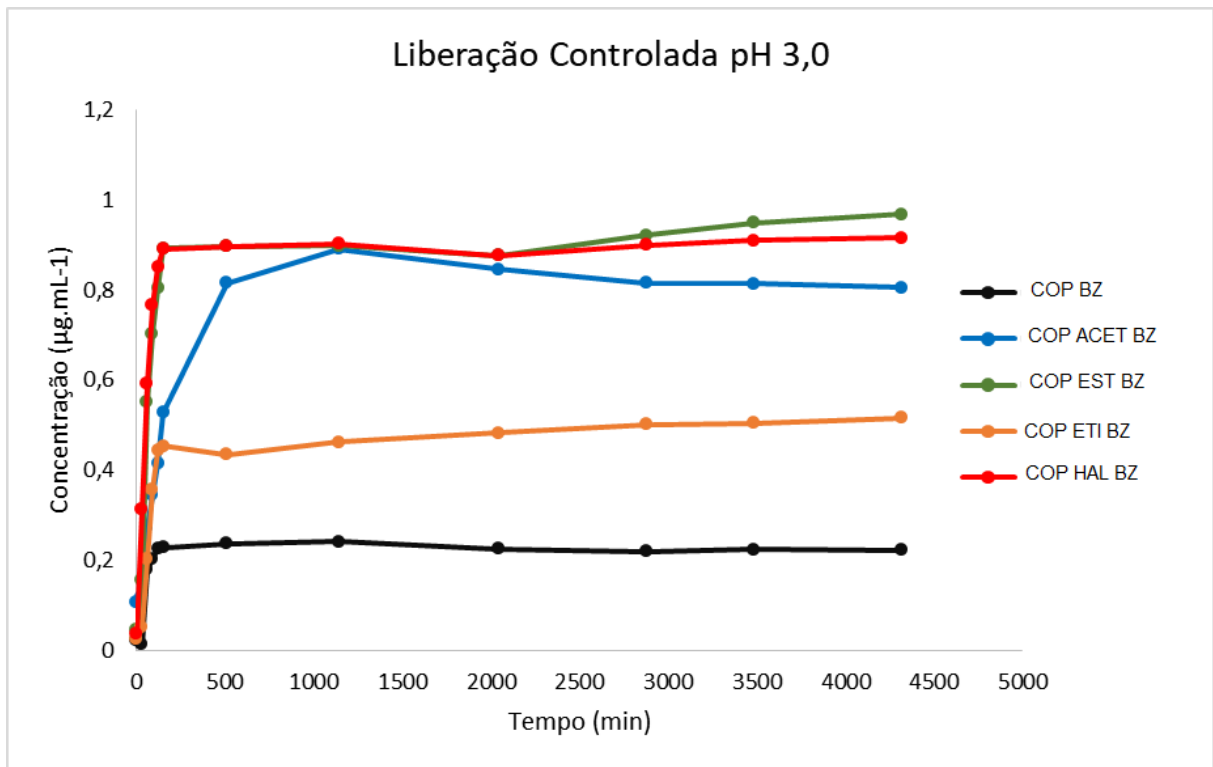


Figura 27: Gráfico de liberação controlada dos copolímeros incorporados em pH 3,0

Com relação a liberação controlada no pH 7,3 apresentada na Fig 28, todos os copolímeros apresentaram perfil de liberação contínuo, estando portanto dentro do resultado esperado. Além disso, pode-se visualizar que COP ACET BZ teve uma maior concentração de liberação até mesmo quando comparado com a maior liberação no pH 3,0. Em ambos pHs verifica-se uma maior liberação inicial, que pode estar relacionada com o fármaco adsorvido na superfície do polímero e que interagiu menos com a matriz, sendo portanto de liberação mais fácil. Também é possível evidenciar a influência da modificação realizada no polímero na

liberação do fármaco, uma vez que a intensidade da interação do fármaco com o polímero está diretamente relacionada com a liberação do mesmo. O ideal é que haja uma interação entre os dois, e que a mesma seja intensa o suficiente para proteger o fármaco, das ações do ácido gástrico por exemplo, mas que seja fácil de ser rompida para que ele seja liberado no organismo.

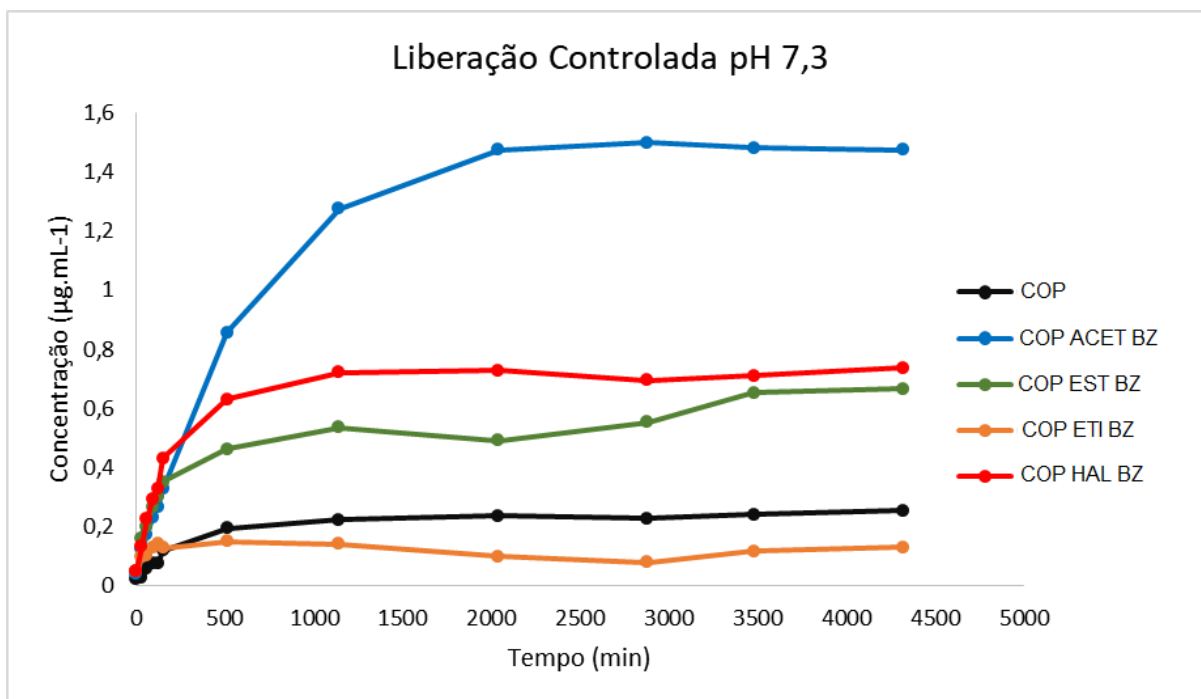


Figura 28: Gráfico de liberação controlada dos copolímeros incorporados em pH 7,3

Ao se comparar a liberação em cada pH pode-se dizer que em ambas a liberação é satisfatória, ressaltando que no pH 3,0 a concentração de liberação inicial o que corrobora com o descrito na monografia do fármaco, que diz que o perfil de dissolução do mesmo em meio ácido é melhor. (SCHAFFAZICK, 2003) (FB, 6^a ed)

10. Ensaio de Viabilidade Celular

Foi realizado o ensaio de viabilidade celular dos copolímeros incorporados com o benznidazol para verificar se os copolímeros seriam tóxicos para as células humanas, o que inviabilizaria seu uso. Quanto menor a porcentagem de viabilidade celular, maior o potencial citotóxico. Portanto, não é considerado citotóxico quando a viabilidade celular fica acima de 70%, ou seja, acima de linha tracejada nas Fig 29 e 30 (ISO, 2009). Foram testados tanto os copolímeros antes quanto após a incorporação em diferentes concentrações (62 µg, 125 µg, 250 µg, 500 µg e 1000 µg). Na Fig 29 é possível visualizar que a viabilidade celular de

todos os copolímeros ficou acima da linha tracejada, que indica o ponto onde há 70% de células viáveis e assim demonstrando que não foi tóxico. Além disso, na Fig 30 é possível perceber que mesmo após a incorporação do fármaco todas as amostras continuaram acima de 70% de viabilidade celular. Era esperado que o copolímero não apresentasse citotoxicidade, uma vez que ambos polímeros de origem, PEG e PMMA são atóxicos e têm seu uso difundido na área médico farmacêutica.

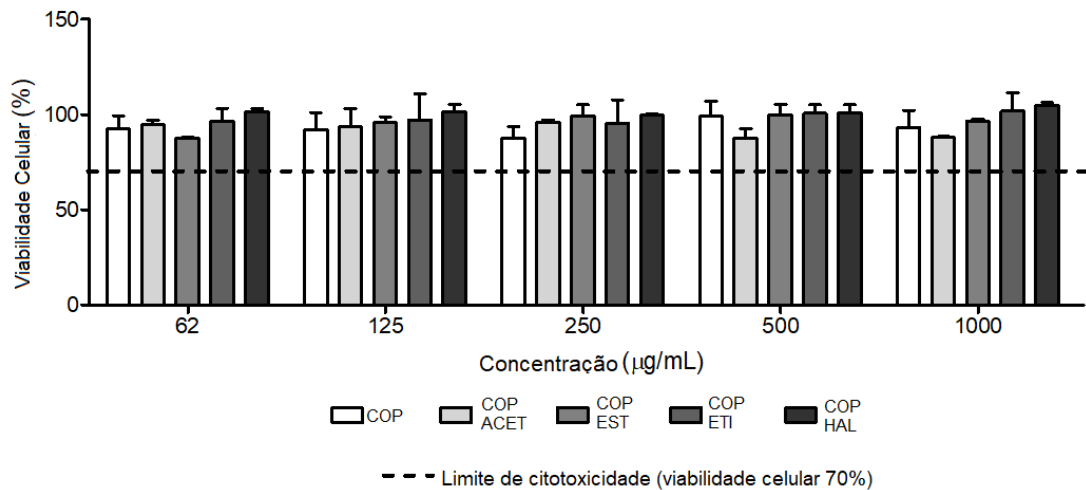


Figura 29: Gráfico de viabilidade celular dos copolímeros

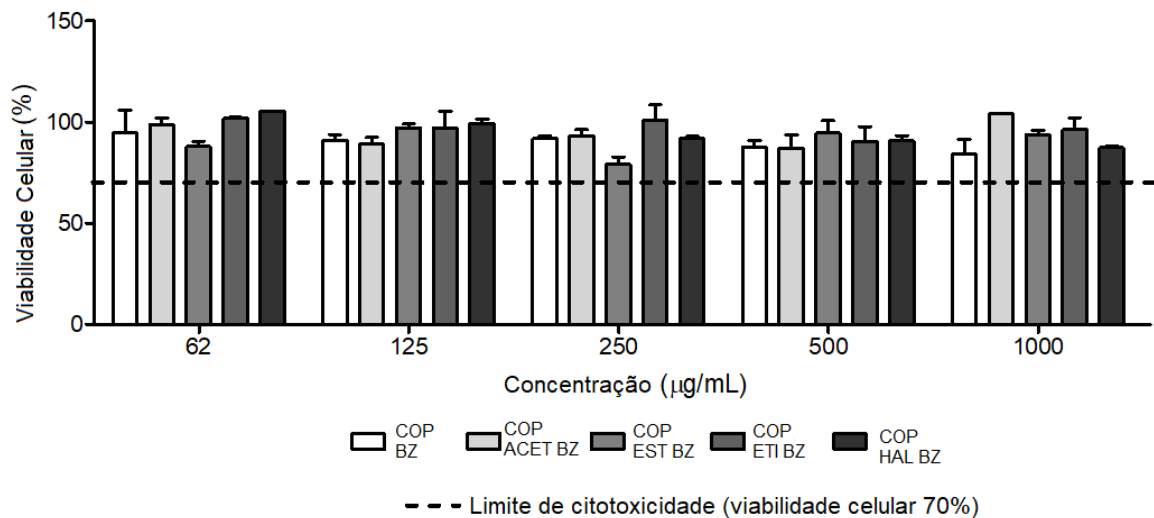


Figura 30: Gráfico de viabilidade celular dos copolímeros incorporados

CONCLUSÃO

- As caracterizações e o aspecto físico confirmam que as reações de incorporação ocorreram de forma efetiva.
- As modificações realizadas na cadeia do copolímero têm grande influência na força da interação da mesma com o fármaco e com a incorporação.
- A incorporação do benznidazol nas cadeias do copolímero induz à formação de microesferas, evidenciando a eficiência da incorporação.
- Nenhum copolímero foi tóxico para células humanas, indicando que pode ser usado em organismo vivo.
- Todos copolímeros apresentaram perfil de liberação controlada satisfatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, K.A.S. Estabilização radiolítica do poli (metacrilato industrial). 2005. 95p. Dissertação (Mestrado Programa de pós-graduação em tecnologias energéticas e nucleares), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/9627/arquivo9071_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ALVES, A. E. G. Obtenção de sistema microparticulado Benznidazol:ZIF-8 para liberação prolongada otimizando o tratamento da doença de Chagas, 2016.

AZEVEDO, M. L. S. et al. Study of Controlled Release of PMMA-g-PEG Copolymer and Derivatives Incorporated with the Indomethacin Drug. **Macromolecular Symposia**, v. 381, n. 1, p. 1–8, 2018.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, 6ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2019.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2ª ed. 2006

CASTANHO, G. M. Comportamento ambiental do polietilenoglicol em solos brasileiros. 2009. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-17122009-165332/>>.

CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F. et al. Síntese de copolímeros metacrílicos através da modificação química do poli(metacrilato de metila) de massa molar Controlada. **Polímeros**, v. 9, n. 4, p. 156–162, 1999.

CHAVES, P. S.; Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas mucoadesivas para administração sublingual de carvedilol. Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2017. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/175138/001055568.pdf?sequence=1>>

CHIENG, B. W. et al. Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: Effects of graphene nanoplatelets. **Polymers**, v. 6, n. 1, p. 93–104, 2014.

DA CUNHA FILHO, M. et al. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. v. 49, n. 4, p. 279–283, 2013.

DAVANÇO, M. Farmacocinética do Benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada. **Aleph**, 2015.

DE CAMPOS, D. L. P. et al. Avaliação histopatológica do polimetilmetacrilato em ratos ao longo de um ano. **Rev. bras. cir. plást.**, v. 26, n. 2, p. 189–193, 2011.

DE PONTES, V. M. O. et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benznidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182–187, 2010.

DOS SANTOS ROSA, J. et al. Chemistry modification of PMMA-g-PEG copolymer. **Macromolecular Symposia**, v. 343, n. 1, p. 78–87, 2014.

DOS SANTOS, V. M. R. et al. Síntese e caracterização de novos copolímeros fosforilados. **Polimeros**, v. 25, p. 19–24, 2015.

FERREIRA, K. DO N. Estudo da Liberação controlada de sinvastatina utilizando nanofibras de PLA/PEG produzidas por fiação por sopro em solução. p. 90, 2017.

FERREIRA, M. et al. Avaliação Do Perfil De Liberação Do Fármaco Ibuprofeno Em Membranas Simétricas E Assimétricas De Acetato De Celulose: Efeito Da Morfologia. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 823–830, 2019.

FERREIRA, V. L. S.; NOVACK, K. M. Efeito da graftização de um biopolímero na modificação da cristalinidade e decomposição de suas cadeias. In: Congresso Brasileiro de

Engenharia e Ciência dos Materiais, Natal – RN, 2002. Anais do CBECIMAT, Natal – RN, p. 4975.

FREITAS, R. L. M. Efeito da temperatura de resfriamento sobre as propriedades de polímeros amorfos e semicristalinos. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10011617.pdf>>.

GIEHL ZANETTI, B.; SOLDI, V.; LEMOS-SENNA, E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 229–236, 2002.

GUDASI, K. B. et al. Synthesis and characterization of novel polyorganophosphazenes substituted with 4-methoxybenzylamine and 4-methoxyphenethylamine for in vitro release of indomethacin and 5-fluorouracil. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 10, p. 1149–1157, 2006.

GUTERRES, S. S. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, vol.26, n.5, pp.726-737. 2003

ISO (International Organization for Standardization), 2009. In: ISO 10993-5 – **Biological Evaluation of Medical Devices**. Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity, 3^a ed. (Suíça).

JOSUÉ, A. et al. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico). **Polímeros**, v. 10, n. 3, p. 116–121, 2000.

JUSTIN, G. A. et al. On-demand controlled release of anti-inflammatory and analgesic drugs from conducting polymer films to aid in wound healing. **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS**, p. 1206–1209, 2012.

KUMBAR, S. G.; AMINABHAVI, T. M. Preparation and characterization of interpenetrating network beads of poly(vinyl alcohol)-grafted-poly(acrylamide) with sodium alginate and their controlled release characteristics for Cypermethrin pesticide. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 84, n. 3, p. 552–560, 2002.

KUMBAR, S. G.; SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M. Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 87, n. 9, p. 1525–1536, 2003.

MANO, E. B.; MENDES, L. C., **Introdução a polímeros**. 2ª edição rev. e ampl. São Paulo: Edgard Blucher, 2004. 191 p.

MAURO, C. F. DE. **Comprimidos De Liberação Controlada**. [s.l.] Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, 2007.

NOVACK, K.; OLIVEIRA, C.; SANCHES, N. Complexação em Solução de Poli(Metacrilato de Metila-g-Óxido de Etileno) e Poli (Metacrilato de Metila-g-Óxido de Propileno) com Picrato de Potássio. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 16–19, 1993.

OLIVEIRA, A. M. Avaliação da contribuição de copolímero de bloco PEG/PPG na estabilidade coloidal de nanocarreadores. **Tecnologia é Inovação**. p. 84-92, 2017

PAVIA L D, LAMPMAN GARY M, KRIZ G S, VYVYAN J R. Book: Introduction to spectroscopy. 5 Ed. Publisher: Cengage Learning. ISBN: 978-1-285-4601-3, 2015.

PARRA, D. F., et al. (2006). "Influence of poly (ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physicochemical and biodegradation properties of poly (3-hydroxybutyrate)." **Polymer Degradation and Stability** **91**: 1954-1959.

PHILIP SKEHAN et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107–1112, 1990.

PONTES, V. M. O. et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182–187, 2010.

RODRIGUES, B. DE C. **Microencapsulação E Liberação Controlada Do fármaco rifampicina utilizando sistema polimérico quitosana-PVA**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

SANTOS, V. M. R. DOS et al. Síntese e caracterização de novos copolímeros fosforilados TT - Synthesis and characterization of new phosphorylated copolymers. **Polímeros**, v. 25, n. spe, p. 19–24, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SEVERINO, P. et al. Polímeros Sintéticos biodegradáveis: Matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polimeros**, v. 21, n. 4, p. 286–292, 2011.

SIEPMANN, J.; SIEGEL, R. A.; RATHBONE, M. J. Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. **Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery**, p. 1–594, 2012.

SILVA, A. M. DOS S. **Nanopartículas catiônicas obtidas por emulsificação com evaporação de solvente para liberação modificada de benznidazol**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

SILVA, M. C.; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 1, n. 1, p. 21–28, 2015.

SILVEIRA, B. M. et al. Preparation, Characterization, and Biological Activity Against Artemia Salina of News Copolymer PMMA-g-PEG Derivatives Incorporated With

Fluconazole. **Macromolecular Symposia**, v. 378, n. 1, p. 1–7, 2018.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v7, n. 2, 2006

TEIXEIRA, K. I. R. **Estudo das alterações da membrana celular de microrganismos por compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polimeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

YANG, Z. et al. Crystallization behavior of poly(ϵ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2658–2667, 2010.