



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



DAIANE RESENDE DO CARMO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS DESTINADAS AO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE
OCULAR**

OURO PRETO

2021

DAIANE RESENDE DO CARMO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS DESTINADAS AO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE
OCULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso 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

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C287d Carmo, Daiane Resende do .
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas
destinadas ao tratamento da toxoplasmose ocular. [manuscrito] / Daiane
Resende do Carmo. - 2021.
53 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola
de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Toxoplasmose ocular. 2. Nanopartículas. 3. Sulfametoxazol. 4.
Trimetoprima. I. Silva, Gisele Rodrigues da . II. Universidade Federal de
Ouro Preto. III. Título.

CDU 616.993.1

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Daiane Resende do Carmo

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas destinadas ao tratamento da toxoplasmose ocular

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de graduação em Farmácia.

Aprovada em 30 de agosto de 2021

Membros da banca

[Profa. Dra.] - Gisele Rodrigues da Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
[Profa. Dra.] - Tamires Cunha de Almeida - (Universidade Federal de Ouro Preto)
[Mestre] - Anieli dos Reis Teixeira - (Universidade Federal de Ouro Preto)

[Gisele Rodrigues da Silva], orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 20/09/2021



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Rodrigues da Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/09/2021, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0222838** e o código CRC **95CC7AD2**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fazer o que sou e por chegar onde estou. Só Ele esteve presente em cada desafio e me deu resiliência e serenidade para seguir meu caminho.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Aparecida, pelo suporte, incentivo e por sempre acreditarem em mim. Palavras seriam insuficientes para agradecer a vocês, que me deram a vida e orientaram meus passos. Agradeço também ao meu irmão, Deivisson, pelo companheirismo e pela força quando mais precisei.

Aos meus avós Nhozinho e Alzira, que em vida foram minha inspiração e que, mesmo ausentes, sei que se alegram neste momento. Aos meus avós Luzia e Zuzu, por tanta sabedoria e por sempre torcerem por mim. À família Carmo e Resende, por serem meus maiores exemplos e por sonharem meus sonhos junto comigo.

Às minhas amigas, Carol, Clara, Karol, Luiza e Tati, por me mostrarem que juntas podemos alcançar tudo. A todos os meus amigos que, diretamente ou indiretamente, fizeram parte desse sonho, me incentivando e contribuindo para que eu não desistisse de trilhar este caminho.

À minha família ouropretana e aos amigos que estiveram comigo durante todos esses anos, especialmente às moradoras, ex-alunas e homenageadas da República Damas de Copos. Aos colegas e amigos da Farmácia, especialmente Anayle, Bia, Isabela, Laura, Lorena, Yukari e Tainá, que estiveram comigo do início ao fim.

À UFOP, à grandiosa Escola de Farmácia e a Ouro Preto, por me permitirem viver histórias incríveis. Também à PROEX, PROPP e LDGNano (Escola de Farmácia - UFOP), pelas oportunidades. Aos colegas do LDGNano e do Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Escola de Farmácia - UFOP), pela disponibilidade e por toda ajuda para a realização experimental deste trabalho, em especial ao Luccas que me acompanhou durante todo o processo.

Às agências de fomento à pesquisa CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Gisele Rodrigues da Silva, pela oportunidade de conduzir este trabalho. Obrigada pelo apoio, por estar sempre presente e pelas discussões que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Serei eternamente grata por sua contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os meus mestres pelos ensinamentos ao longo deste curso e que foram essenciais para que este sonho se tornasse possível.

Aos membros da minha banca por aceitarem o convite e contribuírem para a excelência deste trabalho.

Meu agradecimento especial à Universidade Federal de Ouro Preto pela oportunidade de concluir este curso e a todos desta instituição pelo acolhimento durante estes anos.

Agradeço, enfim, a todos que fizeram parte desta caminhada e que colaboraram de alguma forma para a conclusão desta etapa!

RESUMO

A toxoplasmose ocular é uma doença causada pelo *Toxoplasma gondii*. A infecção ocular deve ser tratada por meio de um esquema terapêutico complexo. Dessa forma, é necessário a compreensão da história natural da doença ocular e dos desafios quanto ao tratamento para que se possa garantir a completa cicatrização da lesão, reduzir efeitos adversos sistêmicos e reduzir a taxa de recorrência da doença. A fim de contornar estes problemas, sistemas de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos como alternativas terapêuticas ao tratamento da toxoplasmose ocular. Neste trabalho, nanopartículas constituídas de poli(ϵ -caprolactona) e sulfametoxazol e trimetoprima foram desenvolvidas com o intuito de liberar estes fármacos diretamente no olho, em concentrações que estejam dentro da faixa terapêutica, ultrapassando as barreiras oculares e tratando as lesões provocadas pelo *T. gondii*. As nanopartículas foram desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação, sendo utilizado o delineamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central para determinar as nanopartículas que apresentam as melhores propriedades físico-químicas. Estes sistemas poliméricos foram caracterizados por meio da análise de tamanho, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ). Determinou-se a eficiência de encapsulação (EE) dos fármacos, sendo esta superior a 87%. Selecionou-se a formulação que apresentou diâmetro de 209 nm, IP de 0,227, PZ de -29,1 mV e EE de 91,45% para sulfametoxazol e 96,26% para trimetoprima; e, a formulação que apresentou diâmetro de 233,3 nm, IP de 0,185, PZ de -31,0 mV e EE de 96,05% e 97,46% para sulfametoxazol e trimetoprima, respectivamente. Estas nanopartículas apresentaram diâmetro compatível à aplicação intraocular e IP que indica a homogeneidade do diâmetro. Adicionalmente, o PZ próximo a -30 mV demonstra a estabilidade das formulações. Os resultados da EE superiores a 87% indicam a alta eficiência do método em encapsular os fármacos. Realizou-se o estudo de biocompatibilidade *in vitro* por meio dos ensaios de citotoxicidade e proliferação de células humanas epiteliais pigmentares da retina (células ARPE-19). Determinou-se que as nanopartículas poliméricas não foram citotóxicas às células, pois as mesmas mostraram-se viáveis. Além disso, as células ARPE-19 proliferaram em direto contato com as nanopartículas quando comparada à proliferação das células do controle, em contato apenas com o meio de incubação. Por fim, as nanopartículas poliméricas constituídas de sulfametoxazol e trimetoprima representam uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento localizado da toxoplasmose ocular.

Palavras-chave: toxoplasmose ocular, sulfametoxazol, trimetoprima, nanopartículas.

ABSTRACT

Ocular toxoplasmosis is a disease caused by *Toxoplasma gondii*. The eye infection must be treated through a complex therapeutic regimen. Thus, it is necessary to understand the natural history of the eye disease and the challenges regarding treatment in order to ensure complete healing of the lesion, reduce systemic adverse effects and reduce the disease recurrence rate. In order to overcome these problems, drug delivery systems have been developed as therapeutic alternatives to the treatment of ocular toxoplasmosis. In this work, nanoparticles consisting of poly(ϵ -caprolactone) and sulfamethoxazole and trimethoprim were developed with the aim of releasing these drugs directly into the eye, in concentrations that are within the therapeutic range, overcoming ocular barriers and treating lesions caused by *T. gondii*. The nanoparticles were developed using the nanoprecipitation method, using a 2^3 factorial design with replicates at the central point to determine the nanoparticles that have the best physicochemical properties. These polymeric systems were characterized through the analysis of size, polydispersion index (PI) and zeta potential (PZ). The encapsulation efficiency (EE) of the drugs was determined, which was higher than 87%. The formulation that presented a diameter of 209 nm, IP of 0.227, PZ of -29.1 mV and EE of 91.45% for sulfamethoxazole and 96.26% for trimethoprim was selected; and the formulation that presented a diameter of 233.3 nm, IP of 0.185, PZ of -31.0 mV and EE of 96.05% and 97.46% for sulfamethoxazole and trimethoprim, respectively. These nanoparticles had a diameter compatible with the intraocular application and PI which indicates the homogeneity of the diameter. Additionally, the PZ close to -30 mV demonstrates the stability of the formulations. EE results above 87% indicate the high efficiency of the method in encapsulating drugs. The in vitro biocompatibility study was carried out through cytotoxicity and proliferation assays of human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19 cells). It was determined that the polymeric nanoparticles were not cytotoxic to the cells, as they proved to be viable. Furthermore, ARPE-19 cells proliferated in direct contact with the nanoparticles when compared to the proliferation of control cells, in contact only with the incubation medium. Finally, polymeric nanoparticles consisting of sulfamethoxazole and trimethoprim represent a promising therapeutic alternative for the localized treatment of ocular toxoplasmosis.

Keywords: ocular toxoplasmosis, sulfamethoxazole, trimethoprim, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma Gondii</i>	17
Figura 2. Estrutura química do sulfametoxazol	22
Figura 3. Estrutura química da trimetoprima	23
Figura 4. Anatomia ocular e vias de administração: as setas pretas mostram diferentes estruturas oculares e as setas vermelhas mostram as vias de administração	26
Figura 5. Representação esquemática de nanopartículas poliméricas: fármaco encapsulado na matriz polimérica	28
Figura 6. Gráfico de Pareto para os efeitos investigados sobre o diâmetro de partícula das nanopartículas obtidas	39
Figura 7. Gráfico de Pareto para os efeitos investigados sobre o IP das nanopartículas obtidas	39
Figura 8. Gráfico de Pareto para os efeitos investigados sobre o PZ das nanopartículas obtidas	40
Figura 9. Viabilidade das células frente às nanopartículas 1 e 8, polímero puro e nanopartículas não incorporadas de fármacos (branco)	44
Figura 10. Imagem microscópica do ensaio de cicatrização de feridas no período inicial e no período final de 24 horas, referentes ao grupo controle e aos quatro materiais experimentais	45
Figura 11. Porcentagem do fechamento <i>in vitro</i> da área de ferida após 24 horas de tratamento	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis dos fatores alterados no delineamento fatorial para otimização da formulação	31
Tabela 2. Matriz de planejamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central aplicado à otimização da formulação de nanopartículas, classificadas de 1 a 8, em que as variáveis independentes: massas de sulfametoxazol e trimetoprima; concentração do Tween 80 e massa da poli(ϵ -caprolactona) foram premeditadamente modificadas	32
Tabela 3. Condições para a eluição em gradiente do método cromatográfico para a quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima incorporado e liberado pelas nanopartículas	34
Tabela 4. Valores de diâmetro, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) obtidos para as nanopartículas das formulações 1 a 8 a partir da realização do delineamento fatorial. A formulação piloto é representada pelo número 9	37
Tabela 5. EE de sulfametoxazol e trimetoprima de acordo com as 9 formulações	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ANOVA	Análise de variância univariada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12
DP	Desvio padrão
EE	Eficiência de encapsulação
H ₂ O	Água
HIV	Human Immuno-Deficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HCL	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IP	Índice de polidispersão
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de tetrazólio
OD	Densidade ótica
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PLA	Ácido polilático
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PZ	Potencial zeta
RPM	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SQR	Substância química de referência
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Toxoplasmose	16
3.1.2 Toxoplasmose ocular	18
3.1.3 Tratamento da toxoplasmose	19
3.1.4 Sulfametoxazol e trimetoprima	22
3.2 Nanotecnologia	24
3.2.1 Administração ocular	25
3.2.2 Nanopartículas	27
3.2.2.1 Nanopartículas poliméricas	27
4. MATERIAIS	30
4.1 Substâncias químicas, polímero e reagentes	30
4.2 Vidrarias e materiais	30
4.3 Equipamentos	30
5. METODOLOGIA	31
5.1 Elaboração das nanopartículas poliméricas – formulação piloto	31
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
5.3.1 Diâmetro da partícula e índice de polidispersão	32
5.3.2 Potencial zeta	33
5.4 Avaliação estatística por ANOVA das formulações obtidas no delineamento fatorial	33
5.5 Método cromatográfico para a quantificação dos fármacos nas nanopartículas	33
5.6 Porcentagem e eficiência de encapsulação	34
5.7 Estudo de biocompatibilidade <i>in vitro</i>	35
5.7.1 Ensaio com MTT	35
5.7.2 Ensaio de migração celular	35

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1 Desenvolvimento das nanopartículas contendo os fármacos, polímero e surfactante	36
6.2 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas após o delineamento fatorial 2³	37
6.3 Porcentagem e eficiência de encapsulação de sulfametoxazol e trimetoprima	41
6.4 Estudo de biocompatibilidade <i>in vitro</i>	43
6.4.1 Ensaio com MTT	43
6.4.2 Ensaio de migração celular	44
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais difundidas do mundo e é transmitida pelo *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1908), um parasita intracelular obrigatório e com alta prevalência sorológica. A retinocoroidite é a lesão mais frequentemente associada à toxoplasmose, uma vez que 30% a 60% dos casos se devem ao *T. gondii*. A toxoplasmose ocular ativa consiste em um foco coagulativo e necrótico bem definido da retina, podendo estar associada a uma inflamação difusa da retina e da coroide sorológica (NEVES *et al.*, 2010).

Devido à complexidade do ambiente ocular, a administração eficiente de medicamentos oculares continua sendo um grande desafio. Em razão de duas barreiras oculares denominadas hematorretiniana e hematoaquosa, os fármacos disseminados sistematicamente não alcançam, em quantidades terapêuticas, o interior do olho (ALDAY; DOGGETT, 2017). Sabe-se que a lesão da retina pode se disseminar ou ampliar, provocando uma reação inflamatória que poderá agravar a uveíte instalada. Por isso, a terapêutica é baseada principalmente na administração de antiinflamatórios e antiparasitários (NEVES *et al.*, 2010).

Convencionalmente, as associações terapêuticas mais utilizadas para o tratamento da toxoplasmose ocular são: a) Clindamicina, sulfadiazina e meticorten, entretanto, a clindamicina altera profundamente a flora intestinal causando colites; b) Pirimetamina, sulfadiazina e meticorten, sendo esta associação a mais usada, exceto durante a gravidez, uma vez que pirimetamina é teratogênica; c) Espiramicina, sulfadiazina e meticorten, administrada quando não se pode usar as associações anteriores; d) Azitromicina, uma alternativa, pois apresenta um bom resultado sem causar efeitos adversos; e) Sulfametoxazol e trimetoprima, regime supressivo que reduz o risco de doença recorrente, mas também provoca efeitos colaterais sistêmicos (NEVES *et al.*, 2010; FELIX, 2015).

Com o intuito de contornar as desvantagens referentes a administração sistêmica de fármacos, uma alternativa proposta para que se mantenham níveis terapêuticos do fármaco no meio intraocular são os sistemas intravítreos de liberação controlada de fármacos no segmento posterior do olho. Estes sistemas utilizam diferentes tecnologias, como lipossomos, micropartículas e nanopartículas do tipo reservatório ou matricial (MELLO FILHO *et al.*, 2010). Novos sistemas de administração de princípios ativos, baseados em nanopartículas poliméricas, podem superar as barreiras que limitam seletivamente a entrada destes fármacos,

facilitando o seu transporte e proporcionando a sua liberação prolongada diretamente no olho, com o intuito de minimizar os efeitos colaterais sistêmicos (SURI; BEG; KOHLI, 2019).

Um dos métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas é a nanoprecipitação, que se baseia na precipitação e formação controlada de micelas de tamanho coloidal que contêm uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso (FESSI *et al.*, 1989).

Neste trabalho, descreve-se a preparação e caracterização de sistemas nanométricos constituídos por poli(ϵ -caprolactona) (PCL), um polímero biodegradável e biocompatível, e a associação de sulfametoxazol e trimetoprima, fármacos que atuam contra o *Toxoplasma gondii* utilizando o método da nanoprecipitação. Diante do exposto, é necessário o desenvolvimento de uma formulação que permita a liberação dos fármacos diretamente no local de ação e em concentrações que estejam dentro da faixa terapêutica, a fim de permitir o tratamento localizado do processo infeccioso ocular gerado pelo *T. gondii*, que pode levar à cegueira ou à perda parcial da acuidade visual do paciente acometido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver, caracterizar e avaliar a biocompatibilidade de nanopartículas poliméricas destinadas ao tratamento da toxoplasmose ocular.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Utilizar o método de nanoprecipitação para o desenvolvimento farmacotécnico de formulações nanoparticuladas contendo sulfametoxazol, trimetoprima, PCL e Tween 80 (formulação piloto);
- ✓ Otimizar a formulação piloto por meio do delineamento fatorial com réplicas no ponto central;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas por meio da determinação do diâmetro da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta;
- ✓ Verificar se os tratamentos aplicados para a elaboração das formulações exercem influência significativa nos resultados analisados;
- ✓ Determinar a eficiência de encapsulação do sulfametoxazol e trimetoprima nos sistemas nanoparticulados;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular *in vitro* das formulações por meio dos ensaios de citotoxicidade e proliferação de células humanas epiteliais pigmentares da retina (ARPE-19).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Toxoplasmose

A toxoplasmose é a doença transmitida pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório, capaz de infectar amplamente vertebrados de sangue quente e até 30% da população em todo o mundo (FELIX, 2015). O parasita apresenta um ciclo de vida complexo, reproduzindo-se tanto de forma sexuada como assexuadamente, e com diferentes estágios morfológicos e metabólicos (NOGUEIRA; LIVERANI, 2014).

Em indivíduos com o sistema imune comprometido, a toxoplasmose pode evoluir para um quadro clínico grave, ocasionando encefalite, retinite ou doença disseminativa, isto é, uma doença capaz de invadir ou avançar sobre outros tecidos. Aqueles indivíduos em tratamento quimioterápico, receptores de órgãos e infectados com HIV estão inclusos no grupo de risco da doença (NEVES *et al.*, 2010). Em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose revela-se acima de tudo por lesões oculares, apresentando-se como responsável por até 85% das uveítes infecciosas do segmento posterior (NOGUEIRA; LIVERANI, 2014). Além disso, o impacto da infecção primária durante a gravidez, assim como a reativação da doença em pacientes imunocomprometidos são fatores preocupantes há décadas (KONSTANTINOVIC *et al.*, 2019).

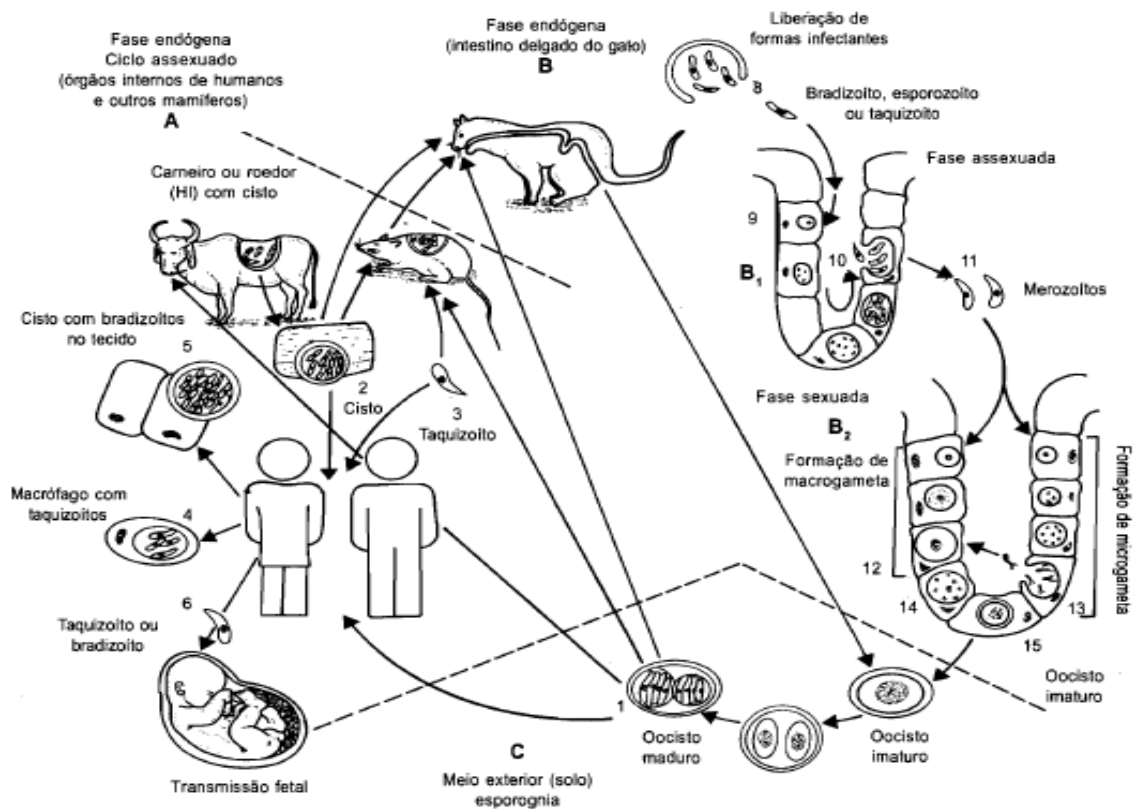
Depois que o parasito foi descoberto e descrito por Nicolle e Manceaux (1907) na Tunísia e por Splendore (1908) no Brasil, testes sorológicos foram desenvolvidos e possibilitaram a visualização de anticorpos anti-*T. gondii* em vários organismos, fator que indicava que a prevalência desta infecção em seres humanos seria ainda mais alta. Em 1909, Nicolle e Manceaux descreveram o parasito e criaram o gênero *Toxoplasma* e a espécie *T. gondii.*, entretanto somente a partir da década de 70 é que seu estudo foi aprofundado (NEVES *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2018).

O *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa, sendo este nome por causa da presença de um complexo apical polar que medeia sua adesão às células do hospedeiro (OZGONUL; BESIRLI, 2017). A maioria das infecções humanas ocorre pela ingestão de oocistos inicialmente produzidos no intestino do felino e que, posteriormente, se espalham pelo ambiente por meio das fezes ou também pela ingestão de cistos nos tecidos em carne mal cozida. A infecção congênita acontece quando o feto é infectado pela mãe durante a gravidez, processo denominado transmissão vertical (ALDAY; DOGGETT, 2017).

O *T. gondii* possui 3 fases infecciosas básicas, com características próprias e bem estabelecidas: a) Taquizoíto: é a forma proliferativa, livre ou trofozoíto, encontrada durante a fase aguda da infecção. É uma forma móvel e de multiplicação rápida; b) Bradizoíto: é a forma encontrada em vários tecidos, geralmente durante a fase crônica da infecção. Os bradizoítos se multiplicam lentamente dentro do cisto, o que dificulta a ação de mecanismos imunológicos do hospedeiro; c) Oocistos: é a forma de resistência, a qual apresenta uma parede dupla resistente às condições do meio ambiente. Os oocistos são gerados nas células intestinais de felídeos não-imunes e, posteriormente, excretados imaturos junto com as fezes. Após esporulação no ambiente contêm dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada, sendo então ingeridos pelo ser humano (NEVES *et al.*, 2010; FELIX, 2015).

O ciclo de vida do *T. gondii* é representado na Figura 1.

Figura 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma Gondii*.



Fonte: NEVES *et al.*, 2010.

O ciclo de vida do *T. gondii*, conhecido como heteroxênico facultativo, permite sua replicação por meio de dois mecanismos: o ciclo sexual e o ciclo assexual. O primeiro ciclo

requer as células intestinais de felinos, enquanto o segundo ocorre em qualquer hospedeiro susceptível, como o homem, outros mamíferos e aves. Os hospedeiros definitivos do parasita são os membros da família *Felidae*, principalmente gatos domésticos e outros felídeos jovens, que desenvolvem a reprodução sexuada em seu trato intestinal. Os felinos ingerem tecidos contendo cistos, que liberam os bradizoítos, os quais são capazes de invadir os enterócitos e sofrer um processo de multiplicação por esquizogonias, diferenciando-se então em gametas masculinos móveis (microgametas) e femininos imóveis (macrogametas). A fusão do micro e macrogameta origina um zigoto diploide, também chamado de oocisto. A liberação do oocisto ainda imaturo para o meio externo se dá através das fezes desses animais e a sua maturação já no solo ocorrerá por um processo denominado esporogonia, apresentando por fim dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos, tornando-se infectante. O ser humano e outros animais, funcionando como hospedeiros intermediários, podem adquirir a toxoplasmose ao contaminar-se com oocistos pela ingestão de alimentos crus que tiveram contato com o solo ou água contaminada; em atividades exercidas diretamente na terra; por contato direto com gatos infectados; ou, no caso das gestantes, a mãe poderá transmitir formas de taquizoítos ao feto, através da circulação placentária. Existe também a possibilidade de contaminação diretamente por taquizoítos ou trofozoítos, por meio de transplante de órgãos ou transfusão de sangue, entretanto são raros estes eventos (NEVES *et al.*, 2010; FELIX, 2015).

A soroprevalência dos anticorpos contra o *T. gondii* varia consideravelmente em todo o mundo, uma vez que as taxas de infecção humana são induzidas pelo clima, consumo de carne mal cozida, hábitos de higiene e exposição contínua a gatos (ALDAY; DOGGETT, 2017). De acordo com Dubey *et al.* (2012), no Brasil, por exemplo, a soropositividade para anticorpos contra *T. gondii* oscila de 20% a 90% entre diversos grupos. Além disso, foram encontradas soroprevalências muito altas, de 36% a 92%, em mulheres grávidas, indicando que a prevalência da doença em crianças e em gestantes no Brasil é uma das mais elevadas mundialmente (DUBEY *et al.*, 2012).

3.1.2 Toxoplasmose ocular

O *T. gondii* foi descrito como responsável por quadros de neuropatia ótica, uveíte anterior e posterior, retinocoroidite e catarata em adultos humanos, uma vez que, após a contaminação, muitos pacientes apresentavam inflamações e cicatrizes em tecidos oculares (VIEIRA *et al.*, 2018).

Em um estudo de Nguyen *et al.* (2011), a toxoplasmose foi a etiologia mais comum da uveíte em pacientes em tratamento e entre todas as outras etiologias obteve uma prevalência de 14%. Segundo Ozgonul e Besirli (2017), vários estudos de diferentes regiões do mundo identificaram a toxoplasmose ocular como a forma mais comum de uveíte posterior. Este quadro, desencadeado por *T. gondii*, apresenta-se de maneira clássica como uma lesão necrosante focal, granulosa, exsudativa e unilateral (DANTAS, 2017).

A retinocoroidite é estabelecida como uma lesão específica da toxoplasmose, sendo que 30% a 60% dos casos se devem ao *T. gondii*. É decorrente de uma infecção crônica com a existência de cistos contendo bradizoítos na retina ou aguda com a presença de taquizoítos (NEVES *et al.*, 2010). Em lesões ativas, é definida por um processo necrótico com inflamação granulomatosa ou não nos tecidos da retina e coróide e, em lesões inativas, por escotomas de tamanho e localização referentes ao desenvolvimento da retinocoroidite (VIEIRA *et al.*, 2018).

A toxoplasmose ocular manifesta-se principalmente na segunda, terceira e quarta década de vida. Torna possível o diagnóstico clínico por gerar, na maior parte dos casos, lesões oculares muito características (NOGUEIRA; LIVERANI, 2014). Entretanto, quando o diagnóstico clínico não puder ser feito asseguradamente por um exame fundoscópico, testes sorológicos podem ser necessários (OZGONUL; BESIRLI, 2017).

O sistema ocular pode ser acometido tanto em casos congênitos bem como em casos adquiridos, sendo frequentemente observadas complicações e recorrências, que podem agravar o quadro ocular e até levar à perda da visão (DANTAS, 2017). Ao exame oftalmológico percebe-se habitualmente uma lesão de retinocoroidite focal, esbranquiçada, acompanhada por uma reação inflamatória que pode ser exuberante e próxima a cicatrizes antigas (NOGUEIRA; LIVERANI, 2014). Outros sinais clínicos usuais de toxoplasmose ocular englobam lesão por satélite, vasculite focal ou generalizada, síndrome inflamatória da hipertensão ocular e cicatriz retinocoroidal (OZGONUL; BESIRLI, 2017).

3.1.3 Tratamento da toxoplasmose

A patogênese única de *T. gondii* apresenta desafios para a terapia medicamentosa. Ao contrário de outros apicomplexos, *T. gondii* atravessa a barreira hematoencefálica e estabelece infecção persistente que pode gerar resistência a medicamentos. Um medicamento ideal para a toxoplasmose alcançaria concentrações terapêuticas, sistêmicas, cerebrais e oculares (ALDAY; DOGGETT, 2017).

Os medicamentos disponíveis para a terapêutica da toxoplasmose são poucos numerosos, sendo os principais: pirimetamina, sulfadiazina e espiramicina. Em algumas situações, como por exemplo, para prevenir a reativação toxoplasmática em pacientes imunocomprometidos, outros tratamentos foram propostos, tais como a associação sulfametoxazol e trimetoprima. Ainda não existe um medicamento que seja eficaz na fase crônica da infecção, uma vez que os fármacos disponíveis agem contra os taquizoítos, mas não contra os cistos. A maioria dos indivíduos com sorologia positiva não apresentam a doença e pelo fato dos medicamentos serem tóxicos em usos prolongados, é recomendado o tratamento apenas dos casos agudos da toxoplasmose ocular e dos indivíduos imunodeficientes. No Brasil, o tratamento específico nem sempre é preconizado nos casos em que o hospedeiro é imunocompetente, exceto em infecção inicial durante a gestação ou quando há comprometimento de outros órgãos, como miocardite e coriorretinite. O Ministério da Saúde recomenda o tratamento da toxoplasmose em gestantes, recém-nascidos e pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 2010; NEVES *et al.*, 2010; DARDÉ; FOUGERE; BUXERAUD, 2018).

A terapia de primeira linha da toxoplasmose consiste na combinação de pirimetamina e sulfadiazina com leucovorina, que é acrescentada para evitar a toxicidade hematológica. Neste caso, a sulfadiazina pode ser substituída por clindamicina se o paciente tiver alergia a fármacos com sulfa. Entretanto, o regime contendo clindamicina é menos eficaz na prevenção de recaídas e apresentou taxas similares de toxicidade (ALDAY; DOGGETT, 2017). A pirimetamina é um antiprotozoário que inibe o metabolismo do ácido fólico, destruindo os taquizoítos. O seu uso não é recomendado nos três primeiros meses de gravidez. Já a sulfadiazina é um antibiótico da classe das sulfonamidas, sendo eficaz no tratamento da toxoplasmose em combinação com a pirimetamina (DARDÉ; FOUGERE; BUXERAUD, 2018).

Quando a terapia de primeira linha é contraindicada, atovaquona ou azitromicina podem ser utilizadas como alternativa para o tratamento e profilaxia da toxoplasmose. No entanto, estes fármacos alternativos apresentam taxas semelhantes de intolerância ao paciente quando comparadas a terapia de primeira escolha (ALDAY; DOGGETT, 2017).

A espiramicina é um antibiótico antibacteriano representante da família dos macrolídeos. É importante quando ocorre soroconversão materna durante a gravidez, sendo possível realizar um tratamento preventivo da passagem transplacentária do parasito (DARDÉ; FOUGERE; BUXERAUD, 2018).

Sulfametoxazol e trimetoprima demonstraram eficácia semelhante à pirimetamina e sulfadiazina sendo utilizados também como alternativa caso a pirimetamina não seja tolerada ou não estiver disponível e/ou quando os pacientes não tiverem alergia as sulfas (ALDAY; DOGGETT, 2017). A escolha terapêutica pode ser orientada também pela disponibilidade ou preço das moléculas, visto que a pirimetamina não está disponível ou não é acessível em muitos países, o que pode explicar o amplo uso de sulfametoxazol e trimetoprima como tratamento de primeira linha nesses países (KONSTANTINOVIC *et al.*, 2019). Além do tratamento da infecção ativa, sulfametoxazol e trimetoprima desempenham um papel profilático na prevenção de toxoplasmose ocular recorrente (OZGONUL; BESIRLI, 2017).

A terapêutica da toxoplasmose ocular consiste substancialmente na administração de um antiinflamatório e antiparasitários. Após o rompimento dos cistos ali presentes, sabe-se que a lesão da retina pode se disseminar ou ampliar, causando uma reação inflamatória capaz de agravar a uveíte instalada (NEVES *et al.*, 2010).

Em 1992, Opremcak *et al.* avaliaram sulfametoxazol e trimetoprima como uma nova opção de tratamento para doenças oculares. Neste estudo, os pacientes obtiveram resolução de retinocoroidite ativa juntamente com melhora da visão. Os autores concluíram que a terapia proposta substituiu seguramente a pirimetamina e sulfadiazina no tratamento da toxoplasmose ocular. No entanto, testes laboratoriais e testes de acompanhamento devem ser considerados ao utilizar esse esquema terapêutico (OPREMCAK *et al.*, 1992; OZGONUL; BESIRLI, 2017).

Em um estudo mais recente, Felix (2015) avaliou o efeito da terapia profilática com sulfametoxazol e trimetoprima em reduzir o risco de recorrências de retinocoroidite. Neste estudo, determinou que a incidência de recorrência de retinocoroidite por toxoplasmose em 12 meses foi de 0% nos grupos sulfametoxazol e trimetoprima, enquanto o grupo placebo apresentou 12,80% (FELIX, 2015).

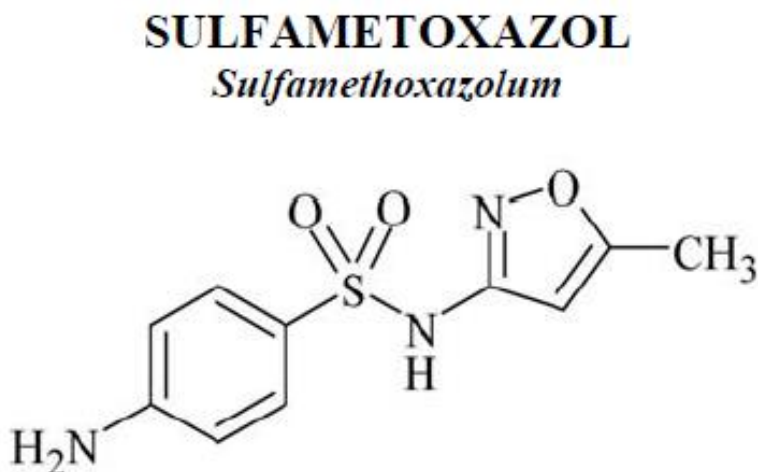
Desta forma, o objetivo do tratamento da toxoplasmose ocular é interromper o dano retinal ao dificultar a multiplicação dos parasitas durante o estágio ativo da retinite e reduzir a gravidade da inflamação, o risco de lesões visuais e de complicações permanentes (MORAIS; ARANTES; MUCCIOLI, 2018). Isto evidencia a necessidade de desenvolver formas farmacêuticas não convencionais que visem a liberação controlada dos fármacos no local de ação e diminuam os efeitos adversos.

3.1.4 Sulfametoxazol e trimetoprima

Sulfametoxazol (Figura 2) é uma sulfa de ação intermediária, com rápida absorção oral, excreção renal prolongada e que se difunde por todo o organismo, alcançando níveis terapêuticos na bile e no liquor. É a sulfonamida mais utilizada em associação com a trimetoprima para o tratamento de infecções por germes sensíveis. As sulfas inibem o metabolismo das bactérias ao competirem com o ácido p-aminobenzóico (PABA) pela enzima diidropteroato sintetase. A associação do sulfametoxazol com a trimetoprima exerce uma ação bactericida cujo mecanismo de ação se caracteriza pela interferência na síntese ou ação do folato, interrompendo uma etapa metabólica essencial que impede o crescimento bacteriano. A associação dos fármacos contém a proporção de uma parte de trimetoprima para cinco partes da sulfa, sendo chamada também de cotrimoxazol. Nessa proporção 1:5, produz um efeito sinérgico, de forma que microrganismos pouco sensíveis a uma delas constantemente se mostram bastante sensíveis à combinação (SILVA, 2008; TAVARES, 2014).

O sulfametoxazol é um pó cristalino branco ou quase branco. É praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em soluções diluídas de hidróxido de sódio e ligeiramente solúvel em álcool etílico (BRASIL, 2019).

Figura 2. Estrutura química do sulfametoxazol.



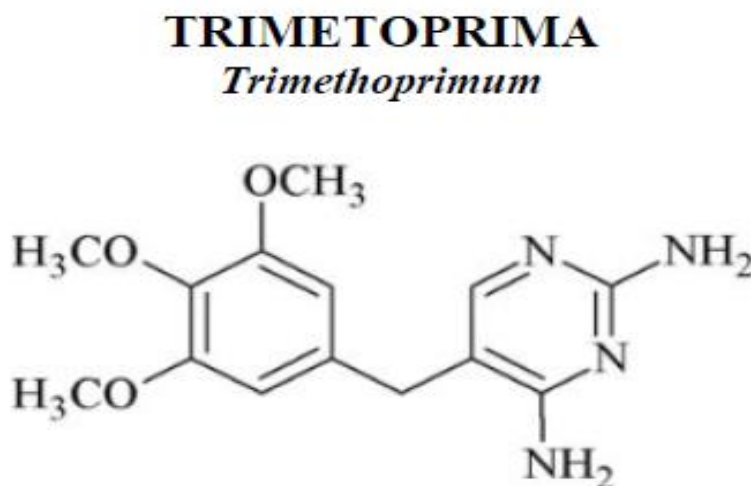
Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2019.

Já a trimetoprima (Figura 3) é um derivado da pirimidina e apesar de exercer isoladamente ação antimicrobiana, sua efetividade é diminuída pelo acúmulo de diidrofolatos que continuam a ser formados pela célula parasitária a partir do PABA. Diante disso, a

associação com derivados sulfonamídicos, que bloqueiam a síntese do ácido fólico, potencializa a sua ação antiparasitária por impedir a formação dos diidrofolatos. Assim, como resultado da associação, surge uma atividade altamente sinérgica contra os microrganismos sensíveis e com baixa toxicidade para o homem. Regularmente, os comprimidos contêm 80 mg de trimetoprima e 400 mg de sulfametoxazol. Também existem apresentações que contêm o dobro destas doses, conhecidas como apresentações reforçadas (TAVARES, 2014).

A trimetoprima é um pó cristalino, branco ou branco amarelado. Geralmente apresenta polimorfismo e tem uma baixa solubilidade em água, sendo ligeiramente solúvel em álcool metílico e pouco solúvel em álcool etílico (BRASIL, 2019).

Figura 3. Estrutura química da trimetoprima.



Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2019.

Quanto à eficácia de sulfametoxazol e trimetoprima, pesquisas realizadas *in vitro* comprovaram ação combinada do sulfametoxazol e da trimetoprima contra o *T. gondii* detectado no interior das células. A associação pode ser empregada na forma ganglionar da toxoplasmose em pacientes imunocompetentes e se mostrou eficaz na profilaxia primária da toxoplasmose em indivíduos com AIDS. Ademais, o uso desse regime na gravidez só deve ser indicado em situações de elevado benefício, como o tratamento da toxoplasmose e da pneumocistose na gestante (TAVARES, 2014).

A associação de sulfametoxazol e trimetoprima é uma alternativa valiosa ao tratamento clássico da toxoplasmose (800mg/160mg via oral, 2 vezes ao dia), o que pode ser explicada pelo seu fácil acesso, baixo custo, boa tolerabilidade e ampla distribuição (FELIX, 2015).

Soheilian *et al.* (2005) comparou a terapia clássica ao sulfametoxazol e trimetoprima, apresentando uma redução similar do tamanho da lesão e resolução da inflamação em todos os casos.

Em 2018, Morais *et al.* descreveram as práticas de tratamento para a toxoplasmose ocular no Brasil. Em sua pesquisa com especialistas brasileiros em uveíte, 57,4% dos entrevistados escolheram sulfametoxazol e trimetoprima para o tratamento de indivíduos imunocompetentes. Em relação ao tratamento profilático de recidiva com sulfametoxazol e trimetoprima, 83,3% relataram o uso desse regime em pacientes com recaídas frequentes, enquanto 61,1% mencionaram o uso desse tratamento para aqueles em risco de perda visual grave. Além disso, a aderência ao tratamento pelos pacientes para a associação de sulfametoxazol e trimetoprima foi considerado bom, regular, e ruim/muito ruim por 94,4%, 3,7% e 1,9% dos entrevistados, respectivamente. Em comparação, a adesão à sulfadiazina, pirimetamina com ácido folínico foi considerado bom, regular e ruim/muito ruim por 37,0%, 44,4% e 18,5%, respectivamente (MORAIS; ARANTES; MUCCIOLI, 2018).

De acordo com Casoy *et al.* (2020), em sua revisão para avaliar a eficácia dos tratamentos para toxoplasmose ocular, o tratamento mais usualmente prescrito para os pacientes foi sulfametoxazol e trimetoprima (52,3%) seguido por pirimetamina e sulfadiazina (28%). Para mais, demonstrou que 96,9% dos pacientes foram tratados com sucesso, indicando que todos os tratamentos utilizados foram altamente eficazes no tratamento dos episódios ativos de toxoplasmose ocular, sendo que a melhor resposta ao tratamento foi de 96,6% para pacientes tratados com o regime sulfametoxazol e trimetoprima (CASOY *et al.*, 2020).

3.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia farmacêutica se aplica à produção, ao desenvolvimento e à caracterização de materiais farmacêuticos com dimensões entre 1 e 100 nm, sendo considerado o limite máximo de até 1.000 nm. Esse âmbito envolve a formulação e o desenvolvimento de nanomedicamentos a fim de melhorar a potência e eficácia do fármaco, além da aplicação dos nanomateriais em tecidos de engenharia e implantes com a finalidade de fabricar estruturas que possam auxiliar na regeneração do tecido dentro do corpo (AULTON; TAYLOR, 2016).

A liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal proporcionar diminuição do número de doses, redução dos efeitos adversos e consequentemente manter o efeito terapêutico desejado, uma vez que há maior facilidade da adesão do paciente ao

tratamento. Os principais sistemas utilizados, incluem-se os lipossomas, as micropartículas e as nanopartículas (MALAQUIAS *et al.*, 2018).

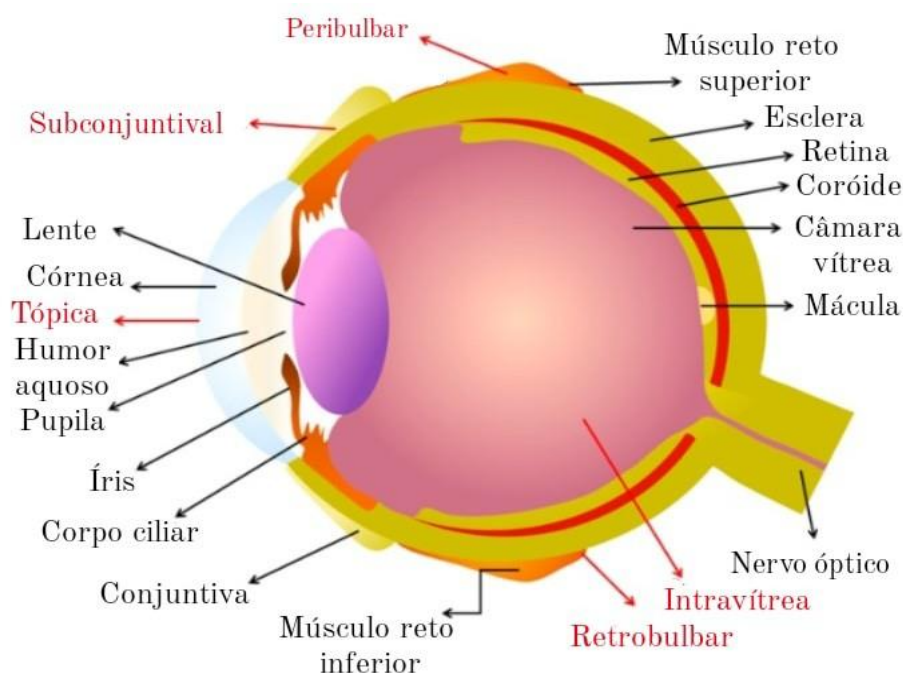
Nanopartículas à base de polímeros, sintéticos ou naturais, fornecem um caminho alternativo para aplicações terapêuticas devido a certas características, como biocompatibilidade, não imunogenicidade, não toxicidade e biodegradabilidade (YETISGIN *et al.*, 2020). Nanopartículas sólidas podem ser formadas por meio de polímeros com a substância associada à superfície da partícula ou incorporada dentro da matriz do polímero, a partir da redução de tamanho das partículas (AULTON; TAYLOR, 2016).

Estes sistemas têm sido planejados, sobretudo, para administração parenteral, oral ou oftálmica, tendo em vista inúmeras aplicações terapêuticas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Nas últimas décadas, a nanotecnologia parece oferecer novas perspectivas no manejo de doenças oculares, realizando liberação controlada, garantindo baixa irritação ocular, melhorando a biodisponibilidade do medicamento ou melhorando a compatibilidade do tecido ocular (WENG *et al.*, 2017). Embora a combinação de nanotecnologia e administração ocular de medicamentos vise um sistema mais específico e direcionado, a estrutura e o ambiente único do olho humano ainda limita seu uso (SURI; BEG; KOHLI, 2019).

3.2.1 Administração ocular

O olho humano é um órgão de estrutura globular com tamanho de cerca de 24 mm e consiste em duas partes principais: os segmentos anterior e posterior. As duas partes têm várias barreiras biológicas para proteger os olhos de substâncias estranhas. A córnea está situada no segmento anterior externo do olho humano, acompanhada pela câmara anterior, pupila, íris, lente e conjuntiva. A porção posterior consiste no corpo vítreo, retina, mácula, nervo óptico, coróide e esclera (WENG *et al.*, 2017; TSAI *et al.*, 2018). A anatomia ocular e as vias de administração oculares tradicionais podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4. Anatomia ocular e vias de administração: as setas pretas mostram diferentes estruturas oculares e as setas vermelhas mostram as vias de administração.



Fonte: Adaptado de WENG *et al.*, 2017.

A administração de medicamentos por vias não invasivas, abrangendo medicamentos orais, pomadas para os olhos e colírios tópicos, tem sido abundantemente utilizada no tratamento de várias doenças oculares, entretanto a maioria é ineficaz e aplicável apenas a sintomas leves iniciais (TSAI *et al.*, 2018).

Injeção intravenosa e dosagem oral são estratégias de administração sistêmica para atingir o olho. Entretanto, as barreiras presentes no ambiente ocular, como a barreira hematorretiniana externa dificulta a entrada da maioria dos fármacos no olho, contribuindo para que apenas 1% a 2% dos medicamentos administrados acessem a retina e o corpo vítreo. Assim, administrar medicamentos no lado interno profundo do olho por administração sistêmica é um desafio (WENG *et al.*, 2017).

Os colírios são a forma primordial de administração tópica devido à boa adesão do paciente e considerações econômicas, mas são menos eficientes no tratamento de doenças oculares posteriores. Já entre as diversas alternativas de injeções tópicas, a injeção intravítrea é a via de administração mais comumente utilizada. Pode servir como uma via de administração eficiente para o tratamento de doenças oculares posteriores, por meio de injeção de solução ou suspensão de fármaco diretamente na cavidade, sem causar desconforto. Por outro lado, a

injeção periocular inclui uma série de injeções tópicas que são utilizadas para ultrapassar os inconvenientes da administração sistêmica e aumentar a concentração do fármaco nos tecidos intraoculares, podendo ser menos invasivas que a injeção intravítrea (WENG *et al.*, 2017).

Um grande interesse nas nanopartículas é sua administração oftálmica, a fim de garantir o aumento da biodisponibilidade ocular, o controle da liberação e a diminuição dos efeitos adversos devido à absorção sistêmica de certos fármacos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanopartículas apresentam vantagens tais como sua capacidade de converter e sustentar a droga na forma não ionizada na área pré-córnea e conjuntival, além de melhorar o transporte de medicamentos através de diferentes barreiras oculares e nos tecidos intraoculares (SURI; BEG; KOHLI, 2019).

3.2.2 Nanopartículas

As nanopartículas podem ser classificadas em nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si de acordo com sua composição e organização estrutural. Nas nanocápsulas, uma membrana polimérica exclusiva envolve agentes terapêuticos ao redor de um núcleo oleoso, enquanto nas nanoesferas os agentes terapêuticos são diretamente dispersos por toda a matriz polimérica ou dentro da matriz polimérica, além de não apresentar óleo em sua composição (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; YETISGIN *et al.*, 2020).

A associação de agentes terapêuticos com nanopartículas exibindo propriedades físico-químicas e biológicas únicas e projetando seus caminhos para direcionamento adequado é uma abordagem promissora no fornecimento de uma ampla gama de moléculas para determinados locais do corpo (YETISGIN *et al.*, 2020). Além disso, a administração ocular de nanopartículas pode ser utilizada com a finalidade de reduzir a irritação do olho (TSAI *et al.*, 2018).

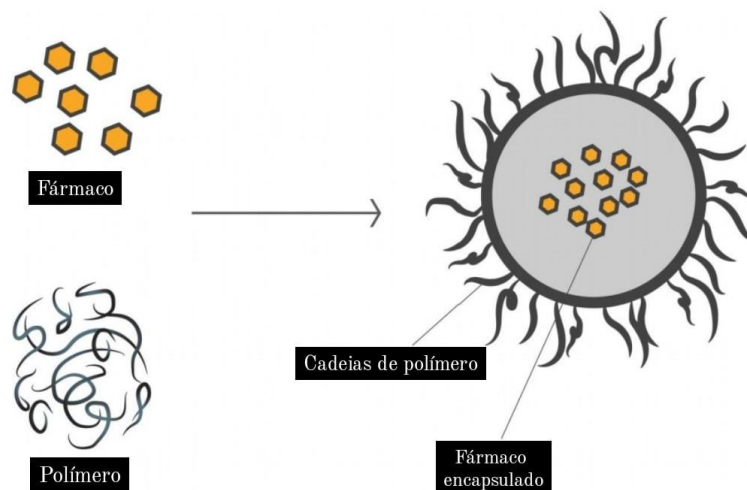
Sendo assim, no presente estudo, optou-se pelo desenvolvimento de formulações contendo sulfametoxazol e trimetoprima em nanocarregadores para o tratamento da toxoplasmose ocular. A elaboração de nanopartículas é uma alternativa para contornar os problemas relacionados a biodisponibilidade dos fármacos e possibilitar o tratamento localizado da toxoplasmose ocular.

3.2.2.1 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são consideradas como o sistema da matriz, no qual a matriz é dispersa uniformemente (YETISGIN *et al.*, 2020). Em geral, as nanopartículas poliméricas

são formuladas a partir de polímeros naturais ou sintéticos, sendo que os mais explorados são os biodegradáveis, como o ácido polilático (PLA), o poli (lático-co-glicólido) PLGA, a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e os polissacarídeos (AULTON; TAYLOR, 2016). Na Figura 5 está uma representação esquemática de como ocorre o encapsulamento de um fármaco em um polímero para a formação de nanopartículas.

Figura 5. Representação esquemática de nanopartículas poliméricas: fármaco encapsulado na matriz polimérica.



Fonte: Adaptado de RIVAS *et al.*, 2017.

Uma exigência importante para que os materiais poliméricos possam ser empregados na preparação de sistemas de liberação de fármacos é que estes e os seus produtos de degradação apresentem uma boa biocompatibilidade e não sejam tóxicos (MALAQUIAS *et al.*, 2018).

De fato, as nanopartículas poliméricas biodegradáveis podem servir como nanocarreadores adequados com o objetivo de resolver o problema de administração frequente, proteger o medicamento do contato com enzimas e proteínas na circulação, além de possibilitar que os fármacos incorporados sejam mantidos com liberação controlada na área desejada. Além disso, para a terapia ocular, as propriedades de entrega das nanopartículas podem ser manipuladas para alcançar a região desejada nos segmentos anterior ou posterior do olho ao se modificar o seu tamanho/carga. Diante disso, o seu tamanho pequeno também pode auxiliar na superação da barreira hematorretiniana (TSAI *et al.*, 2018)

A existência de infinitas metodologias de preparação de nanopartículas poliméricas mostra a capacidade de controlar as particularidades de liberação de agentes terapêuticos incorporados, o que garante a entrega de uma maior concentração terapêutica no local alvo

(YETISGIN *et al.*, 2020). Existem diversos procedimentos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser principalmente classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Um método favorável para obter nanopartículas de PLGA descrito por Morales-Cruz *et al.* (2012) foi a nanoprecipitação, procedimento desenvolvido por Fessi *et al.* (1989) e que permite a produção de partículas na faixa de 100 a 300 nm. As vantagens deste método incluem um passo único, que não exige graus de agitação, cisalhamento, sonificação ou altas temperaturas. O método de nanoprecipitação é adequado para compostos hidrofóbicos que são solúveis em acetona ou etanol, contudo apresentam solubilidade limitada na água (MORALES-CRUZ *et al.*, 2012).

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético biodegradável da família dos poliésteres, parcialmente cristalino, hidrofóbico, linear e pode ser lentamente biodegradado por microrganismos. Um polímero biodegradável é caracterizado como um polímero que sofre degradação química *in vivo*, seja por ação enzimática ou hidrólise, capaz de originar produtos não tóxicos e biocompatíveis, que são metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas usuais (MALAQUIAS *et al.*, 2018).

Diante do exposto, este trabalho descreve a elaboração de nanopartículas constituídas por PCL e a associação de sulfametoxazol e trimetoprima utilizando o método de nanoprecipitação.

4. MATERIAIS

4.1 Substâncias químicas, polímero e reagentes

- ✓ Acetona P.A (C.R.Q®);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC;
- ✓ Água ultrapura purificada em sistema Milli-Q®;
- ✓ Poli (ε-caprolactona) - PCL (AldrichChemistry®);
- ✓ Polissorbato (Tween 80) (Vetec®);
- ✓ Sulfametoxazol SQR;
- ✓ Trietilamina grau HPLC;
- ✓ Trimetoprima SQR.

4.2 Vidrarias e materiais

- ✓ Balões, buretas e pipetas volumétricas calibradas;
- ✓ Béqueres;
- ✓ Eppendorfs (2mL);
- ✓ Vials para cromatografia (2mL).

4.3 Equipamentos

- ✓ Balança analítica Shimadzu®, modelo AUW220D;
- ✓ Centrífuga MPW Med. Instruments®, modelo MPW 260R;
- ✓ Cromatógrafo Waters Alliance®;
- ✓ Micropipetas automáticas;
- ✓ Vórtex;
- ✓ Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®).

5. METODOLOGIA

5.1 Elaboração das nanopartículas poliméricas – formulação piloto

As nanopartículas foram produzidas utilizando a técnica de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989). Por meio da solubilização de 50 mg de PCL em 8 mL de acetona, preparou-se uma solução (fase orgânica). À esta solução foram adicionados 2 mg de sulfametoxazol e 0,400 mg de trimetoprima. Esta solução foi transferida, por gotejamento, 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. A solução formada (formulação piloto) permaneceu a temperatura ambiente (25-30° C), sob agitação magnética, durante 8 horas, para evaporação da acetona.

5.2 Planejamento experimental para o desenvolvimento de nanopartículas utilizando delineamento fatorial 2³ com réplicas no ponto central

Para o delineamento fatorial, as nanopartículas foram preparadas conforme o método de nanoprecipitação descrito no item anterior. A partir da formulação piloto, foram desenvolvidas 8 formulações por meio da variação de 3 fatores determinantes para o seu desenvolvimento [massas de sulfametoxazol e trimetoprima, concentração do Tween 80 e massa da poli (ϵ -caprolactona)]. Cada um destes fatores foi avaliado em 2 níveis [nível alto (+1) e nível baixo (-1)] (Tabela 1), com repetições no ponto central (0). As condições que se mantiveram fixas foram: (1) volume de acetona (8 mL) e (2) volume da solução aquosa (5 mL).

Tabela 1. Níveis dos fatores alterados no delineamento fatorial para otimização da formulação.

Variáveis independentes	Nível baixo (-1)	Ponto central (0)	Nível alto (+1)
Massas de sulfametoxazol e trimetoprima	1 mg e 0,200 mg	2 mg e 0,400 mg	3 mg e 0,600 mg
Concentração do Tween 80	0,5% (m/v)	1% (m/v)	1,5% (m/v)
Massa de poli(ϵ -caprolactona)	25 mg	50 mg	75 mg

Abreviaturas: % m/v= porcentagem massa/volume; mg= miligrama.

A Tabela 2 representa a matriz do delineamento fatorial, no qual foram preparadas 8 formulações de nanopartículas, sendo estas enumeradas de 1 a 8. A formulação 9 representa a formulação piloto, cujas variáveis independentes não foram alteradas [ponto central (0)] e foram preparados 5 lotes.

Tabela 2. Matriz de planejamento fatorial 2³ com réplicas no ponto central aplicado à otimização da formulação de nanopartículas, classificadas de 1 a 8, em que as variáveis independentes: massas de sulfametoxazol e trimetoprima; concentração do Tween 80 e massa da poli (ϵ -caprolactona) foram premeditadamente modificadas.

Formulações	Massas de sulfametoxazol e trimetoprima	Concentração do Tween 80 (% m/v)	Massa da poli (ϵ-caprolactona) (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

Abreviaturas: % m/v= porcentagem massa/volume; mg= miligrama.

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

5.3.1 Diâmetro da partícula e índice de polidispersão

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (IP) das nanopartículas da formulação piloto e das 8 formulações do delineamento fatorial foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica. As análises foram realizadas da seguinte forma: 2 μ L de cada formulação foram diluídos em 1 mL de água ultrapurificada e transferidos para cubeta de vidro. O resultado foi obtido através da utilização do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). As leituras foram realizadas à 25°C, em triplicata, e os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

5.3.2 Potencial zeta

O potencial zeta (PZ) das nanopartículas foi determinado a partir da mobilidade eletroforese por anemometria de laser doppler num campo elétrico de 150 V/cm (Zetasizer Nano ZS/Malvern Instruments). Para a determinação deste parâmetro, 2 µL de cada formulação foram diluídos em 1 mL de água ultrapurificada e transferidos para a cubeta ômega. Estas nanopartículas foram analisadas em triplicatas à 25°C.

5.4 Avaliação estatística por ANOVA das formulações obtidas no delineamento fatorial

O diâmetro de partícula, IP e PZ obtidos para as nanopartículas da formulação piloto e das formulações 1 a 8, que foram produzidas após a modificação deliberada das variáveis independentes (massa dos fármacos, massa do surfactante e massa do polímero), foram comparados por análise de variância uni-variada (ANOVA). Admitiu-se intervalo de confiança de 95%, sendo os valores de $p < 0,05$ reconhecidos como estatisticamente significativos.

5.5 Método cromatográfico para a quantificação dos fármacos nas nanopartículas

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado para a quantificação dos fármacos apresenta os seguintes parâmetros cromatográficos: Cromatógrafo Waters Alliance®, coluna ACE C18 (150 mm x 4,6 mm, e 5µm de tamanho de partícula), volume de injeção de 10 µL, temperatura de 30 °C, comprimentos de onda de detecção para sulfametoxazol e trimetoprima iguais a 240 e 270 nm, respectivamente, e eluição em gradiente conforme descrito na Tabela 3. Para o preparo da Fase A misturou-se 1400 mL de água, 400 mL de acetonitrila e 2 mL de trietilamina em balão volumétrico de 2000 mL. Ajustou-se o pH para $5,9 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio 0,2 M ou ácido acético glacial e completou-se o volume com água. Para a Fase B empregou-se o mesmo procedimento, mas somente a acetonitrila foi utilizada. Para o preparo das soluções foram pesados e transferidos 25 mg de cada fármaco para balões volumétricos de 5 mL, completando-se o volume com acetonitrila. As soluções estoque resultantes apresentaram concentração de 5000 µg/mL e foram diluídas para a obtenção de soluções a 100 µg/mL de cada um dos fármacos (BRASIL, 2019).

Tabela 3. Condições para a eluição em gradiente do método cromatográfico para a quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima incorporado e liberado pelas nanopartículas.

Tempo (minutos)	Fase A* (%)	Fase B* (%)
0 – 10	100	0
10 – 20	15	85
20 -22	100	0

*Fase A: Acetonitrila e H₂O (4:1) + Trietilamina 0,1% (p/v); *Fase B: Acetonitrila. Abreviaturas: H₂O= água; % p/v= porcentagem em peso/volume.

5.6 Porcentagem e eficiência de encapsulação

Sulfametoxazol e trimetoprima foram quantificados nas nanopartículas das formulações 1 a 8, com a finalidade de se determinar a eficiência de encapsulação (EE) destes fármacos nos sistemas. As nanoformulações foram homogeneizadas com o auxílio de um vórtex e o fármaco não encapsulado foi removido utilizando centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 8 °C. Posteriormente, 1 mL de sobrenadante de cada lote preparado foi adicionado a 1 mL da fase móvel e agitou-se. Todas estas soluções foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e calculada a eficiência de encapsulação. Os resultados foram representados pelos dados referentes a área sobre a curva, calculando-se a média, variância, desvio padrão e desvio padrão relativo das nanopartículas e padrão referente a cada fármaco. Com base nas médias, foram calculados a porcentagem de fármaco não encapsulado (Equação 1) e a eficiência de encapsulação (Equação 2), conforme descrito abaixo.

Equação 1

$$\% \text{ fármaco não encapsulado} = \frac{\text{Concentração encontrada no sobrenadante } (\mu\text{g}) \times 100}{\text{Quantidade de fármaco colocada na nanopartícula } (\mu\text{g})}$$

Equação 2

$$\text{Eficiência de encapsulação} = 100\% - \% \text{ fármaco não encapsulado}$$

5.7 Estudo de biocompatibilidade in vitro

5.7.1 Ensaio com MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Aproximadamente 5×10^4 células ARPE-19 foram semeadas em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas, o meio foi descartado e novo meio DMEM/F-12 10% SBF contendo as nanopartículas das formulações 1 e 8 foi colocado em contato com as células. Após 24 horas, o meio foi descartado, e 170 μL da solução de MTT (5 mg/mL) e 210 μL do meio de cultura foram adicionados a cada poço. Após 2 horas, os cristais de formazan foram dissolvidos em 210 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) em HCl 0,1 mol/L. Após 18 horas, 100 μL de solução foram transferidos para uma placa de 96 poços e a densidade ótica (OD) foi medida em 595 nm. As células que receberam o meio sem as nanopartículas foram submetidas às mesmas condições experimentais. Células ARPE-19 sem tratamento foram consideradas o controle e foram fixadas como sendo 100% de viabilidade. A viabilidade celular foi demonstrada por meio de um histograma (FERNANDES-CUNHA *et al.*, 2016).

5.7.2 Ensaio de migração celular

Para determinar a taxa de migração celular das células ARPE-19 foi realizado o ensaio de cicatrização de feridas que consiste em criar uma ferida e mensurar a taxa de migração das células. Para isso, foram utilizadas duas placas de cultura de 12 poços e as células foram plaqueadas em uma concentração de 3×10^5 células/poço. Após 48 horas de incubação a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade e as células já confluentes em monocamada, foi realizado um arranhão com o uso de uma ponta de uma pipeta. O meio de cultura foi aspirado e as células que se desprenderam foram lavadas com meio DMEM/F-12 10% SBF. Em seguida, colocou-se 1 mL de meio DMEM/F-12 10% SBF e as nanopartículas das formulações 1 e 8. As células sem tratamento foram utilizadas como controle. No tempo zero e após 24 horas, a área da ranhura foi fotografada utilizando um microscópio invertido no primeiro período (tempo 0), bem como após 24 h do tratamento, utilizando uma objetiva que permite a visualização de ambas as bordas da ferida (MENDES, 2019).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento das nanopartículas contendo os fármacos, polímero e surfactante

As nanopartículas desenvolvidas baseiam-se em sistemas monolíticos produzidos pelo polímero PCL e a associação dos fármacos sulfametoxazol e trimetoprima. Estas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, patenteado por Fessi *et al.* (1989). Este método é empregado principalmente para o encapsulamento de princípios ativos hidrofóbicos, com a formação de nanocápsulas ou nanoesferas (RIVAS *et al.*, 2017). A nanoprecipitação é um mecanismo preponderante para formular esses tipos de fármacos, uma vez que o desenvolvimento de nanopartículas pode melhorar a solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos insolúveis, aumentando assim sua biodisponibilidade, além de permitir o controle da cinética de liberação e sua estabilidade, a fim de alcançar propriedades desejáveis (LIU *et al.*, 2020).

Conforme descrito por Fessi *et al.* (1989), a nanoprecipitação requer o preparo de uma fase orgânica e uma fase aquosa. Envolve o uso de um solvente orgânico que é completamente miscível com a fase aquosa, como acetona, etanol, metanol, hexano, metileno, cloreto ou dioxano. Primordialmente, a fase aquosa é constituída pela água. Vários polímeros são usados para encapsular os fármacos por este método. Entre eles citam-se os poliésteres biodegradáveis, tais como, polilactídeo (PLA), polilactídeo-co-glicólido (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL). As nanopartículas são formadas pela adição gota a gota da fase orgânica, contendo o polímero hidrofóbico e os respectivos fármacos, a uma solução aquosa sob agitação magnética moderada. Assim que o polímero se difunde no meio de dispersão, ele precipita, envolvendo o aprisionamento imediato do fármaco. Após a formação das nanopartículas, ultracentrifugação e liofilização são dois métodos que podem ser empregados na etapa de remoção da fase aquosa, resultando, finalmente, na formação das nanoesferas (FESSI *et al.*, 1989; GRABNAR; KRISTL *et al.*, 2011; NICOLAS *et al.*, 2013; RIVAS *et al.*, 2017).

Primeiramente, desenvolveu-se e caracterizou-se uma formulação piloto, conforme descrito no item 5.1 deste trabalho. A etapa de caracterização abrange as análises quanto ao tamanho, IP, PZ e EE. Após os resultados da formulação piloto foram feitas as demais formulações, através do delineamento fatorial 2^3 com réplicas no ponto central por meio da variação dos 3 fatores independentes (massa de sulfametozaxol e trimetoprima, massa de PCL e concentração do Tween 80). As condições iniciais selecionadas proporcionaram a formação de sistemas nanométricos e, posteriormente, viabilizaram a escolha das melhores formulações.

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

Com a finalidade de determinar a influência da modificação dos componentes presentes no desenvolvimento das nanopartículas, o delineamento fatorial 2³ com réplicas no ponto central foi empregado. De acordo com os níveis máximo e mínimo dos fatores, conforme o planejamento fatorial, foram preparadas 8 formulações. Os efeitos destes fatores foram avaliados sobre três variáveis: diâmetro de partículas, IP e PZ, como representado na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de diâmetro, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ) obtidos para as nanopartículas das formulações 1 a 8 a partir da realização do delineamento fatorial. A formulação piloto é representada pelo número 9.

Resultados			
Formulação	Diâmetro		
	médio (nm) ± dp	IP ± dp	PZ (mV) ± dp
1	209,5±3,48	0,227±0,21	-29,1±1,03
2	218,0±8,90	0,218±0,038	-33,1±0,55
3	283,1±31,86	0,366±0,036	-28,1±0,65
4	221,5±10,68	0,152±0,045	-37,2±0,36
5	343,2±24,05	0,309±0,049	-32,3±0,10
6	279,8±10,11	0,226±0,051	-30,0±0,45
7	272,1±15,29	0,362±0,025	-25,4±0,65
8	233,3±3,93	0,185±0,011	-31,0±0,47
9*	377,4±29,45	0,354±0,038	-27,7±1,75

*Valores representados como média (n=5). Abreviaturas: dp= desvio padrão; nm=nanômetro; mV=milivolts.

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas como veículos de distribuição de fármacos ganhou maior importância entre as novas formulações. Com o intuito de evitar a biodistribuição descontrolada, eliminação rápida e toxicidade sistêmica, a sua efetividade está relacionada em grande parte com a uniformidade do tamanho de partículas e potencial zeta (SADAT; JAHAN; HADDADI, 2016).

O diâmetro obtido para as formulações estudadas foi de $209,5 \pm 3,48$ a $377,4 \pm 29,45$. Geralmente, mesmo preparadas através de diferentes métodos, as nanopartículas apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm. No entanto, partículas com diâmetros inferiores ou superiores podem ser obtidas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). É importante salientar que a eficiência da maioria dos sistemas de administração de medicamentos está diretamente relacionada ao tamanho das partículas (excluindo intravenosa e solução). As nanopartículas de medicamentos apresentam maior solubilidade e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade, capacidade adicional de atravessar a barreira hematoencefálica, por causa de seu pequeno tamanho e grande área de superfície (RIZVI; SALEH, 2018). As formulações 1, 2, 4 e 8 apresentaram os menores diâmetros evidenciando um tamanho médio favorável à aplicação ocular.

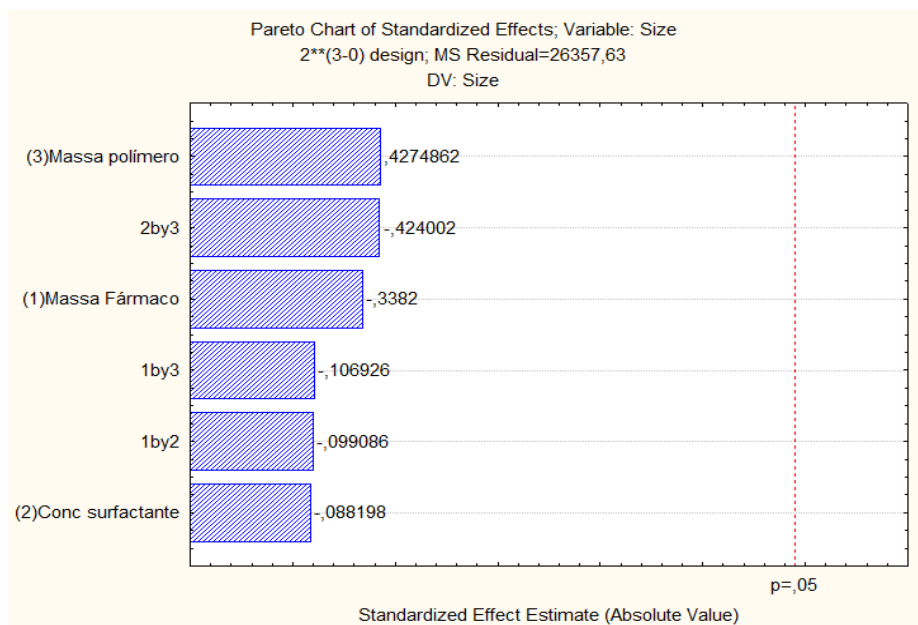
O IP das nanopartículas variou entre $0,152 \pm 0,045$ e $0,366 \pm 0,036$. O índice de polidispersividade avalia a distribuição média do tamanho das nanopartículas. São considerados convenientes valores menores que 0,200 uma vez que indicam a homogeneidade no diâmetro de partículas. Já IP de até 0,300 são considerados adequados para aplicação cutânea, pois indicam que a suspensão é monodispersa (CAZO *et al.*, 2012; BALEST, 2013). As formulações 1, 2, 4, 6 e 8 apresentaram melhores resultados visto que foram obtidos valores próximos a 0,200.

O PZ obtido para as nanopartículas variou de $-25,4 \pm 0,65$ a $-37,2 \pm 0,36$. Quando as nanopartículas são preparadas em solução, ocorre a formação de uma dupla camada elétrica que as cercam. O potencial eletrostático neste limite "plano de cisalhamento hidrodinâmico" é chamado potencial zeta e está relacionado com a carga de superfície das nanopartículas. Aquelas com PZ entre +10 e -10 mV são consideradas aproximadamente neutras. Por outro lado, suspensões coloidais de nanopartículas com PZ superior a +30 mV ou inferior a -30 mV são consideradas muito estáveis no meio de dispersão (CAZO *et al.*, 2012). Este parâmetro é importante para a estabilidade das nanopartículas e seu desempenho em um ambiente biológico (RIVAS *et al.*, 2017). Os resultados encontrados para as formulações 1, 6 e 8, que apresentaram os valores mais próximos a -30 mV, contribuem para a estabilidade das nanopartículas.

Ademais, para uma melhor demonstração dos resultados, os efeitos observados sobre o diâmetro de partícula, IP e PZ das nanopartículas são apresentados no Gráfico de Pareto, nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente. Essa representação gráfica indica que os parâmetros que ultrapassam a linha tracejada exerceram influência significativa sobre as variáveis analisadas,

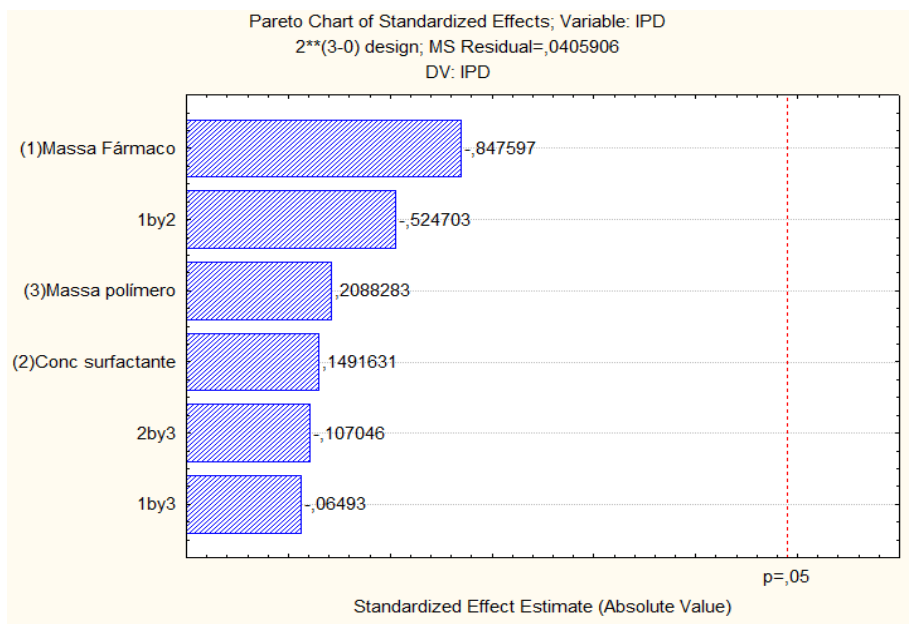
enquanto os que não ultrapassam não são significativos, logo, não exercem influência ao nível de significância de 95% (SANTOS; TOGNOLLI; OLIVEIRA, 2010).

Figura 6. Gráfico de Pareto para os efeitos investigados sobre o diâmetro de partícula das nanopartículas obtidas.



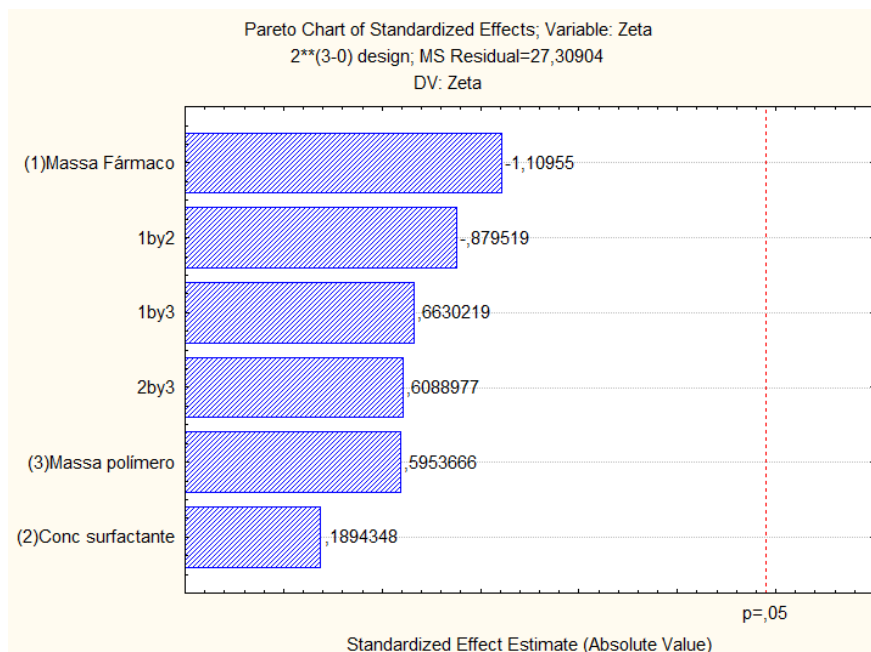
Legenda: Termos individuais: (1) Massa dos fármacos; (2) Concentração do surfactante; (3) Massa do polímero; Termos combinados: 2by3 associação dos fatores (2) e (3); 1by3 associação dos fatores (1) e (3); 1by2 associação dos fatores (1) e (2). Fonte: Autoria própria.

Figura 7. Gráfico de Pareto para os efeitos investigados sobre o IP das nanopartículas obtidas.



Legenda: Termos individuais: (1) Massa dos fármacos; (2) Concentração do surfactante; (3) Massa do polímero; Termos combinados: 1by2 associação dos fatores (1) e (2); 2by3 associação dos fatores (2) e (3); 1by3 associação dos fatores (1) e (3). Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Gráfico de Pareto para os efeitos investigados sobre o PZ das nanopartículas obtidas.



Legenda: Termos individuais: (1) Massa dos fármacos; (2) Concentração do surfactante; (3) Massa do polímero; Termos combinados: 1by2 associação dos fatores (1) e (2); 1by3 associação dos fatores (1) e (3); 2by3 associação dos fatores (2) e (3). Fonte: Autoria própria.

Na Figura 6 observa-se o Gráfico de Pareto para a variável diâmetro de partícula. Não houve uma alteração estatisticamente significativa quando os fatores massa dos fármacos (1), concentração do surfactante (2) e massa do polímero (3) foram deliberadamente modificados no planejamento fatorial, mesmo em termos individuais ou combinados. Os termos individuais analisados estão representados pelos fatores (1), (2) e (3) e os termos combinados estão representados por “2by3” em que foram analisados os fatores (2) e (3); “1by3” em que foram analisados os fatores (1) e (3); e “1by2” em que foram analisados os fatores (1) e (2) combinados. Nenhum dos fatores ultrapassou o nível de significância de 95% representado pela linha tracejada ($p=0,05$). Conforme mostrado no gráfico é possível inferir que, por mais que os parâmetros que compõem as nanopartículas sejam variados intencionalmente, não houve nenhuma influência estatisticamente significativa sobre a variável em questão, neste caso o diâmetro de partícula.

Da mesma forma, na Figura 7 observa-se o Gráfico de Pareto para a variável IP. Os termos individuais analisados foram massa dos fármacos (1), concentração do surfactante (2) e massa do polímero (3). Os termos combinados estão representados por “1by2” em que foram analisados os fatores (1) e (2); “2by3” em que foram analisados os fatores (2) e (3); e “1by3”

em que foram analisados os termos (1) e (3) combinados. Assim como no gráfico anterior, nenhum destes fatores ultrapassou o nível de significância de 95% representado pela linha tracejada ($p=0,05$), sugerindo que por mais que os parâmetros que constituem as nanopartículas sejam alterados, não houve nenhuma influência estatisticamente significativa destes sobre o IP.

Por último, na Figura 8 observa-se o Gráfico de Pareto para a variável PZ. Os termos individuais analisados foram massa dos fármacos (1), concentração do surfactante (2) e massa do polímero (3). Os termos combinados estão representados por “1by2” em que foram analisados os fatores (1) e (2); “1by3” em que foram analisados os termos (1) e (3); e “2by3” em que foram analisados os fatores (2) e (3) combinados. Da mesma maneira que nos gráficos anteriores, nenhum destes fatores analisados ultrapassou o nível de significância de 95% representado pela linha tracejada ($p=0,05$). Isso sugere que, apesar de se modificar deliberadamente estes determinados componentes e suas quantidades na elaboração das nanopartículas, estes parâmetros, individualmente ou combinados, não tiveram influência estatisticamente significativa sobre o PZ. Portanto, os resultados obtidos com o planejamento fatorial foram analisados por ANOVA e segundo a análise estatística dos dados, não há influência significativa de nenhuma das variáveis testadas frente a elaboração das nanopartículas.

6.3 Porcentagem e eficiência de encapsulação de sulfametoxazol e trimetoprima

O teste de eficiência de encapsulação (EE) foi realizado a fim de obter a capacidade de encapsulação dos fármacos frente as nanopartículas. O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizado e os valores referentes as EE de ambos os fármacos estão apresentados na Tabela 5. Todas as formulações apresentaram EE superiores a 87%.

Tabela 5. EE de sulfametoxazol e trimetoprima de acordo com as 9 formulações.

Formulações	EE (%)	EE (%)
	Sulfametoxazol	Trimetoprima
1	91,45	96,26
2	92,20	96,24
3	93,06	95,13
4	92,90	91,38
5	89,38	95,81
6	87,97	95,89
7	95,54	97,82
8	96,05	97,46
9	96,13	97,48

A determinação da eficiência de encapsulação de sulfametoxazol e trimetoprima associada às nanopartículas é complexa devido ao seu tamanho reduzido. Diversos fatores influenciam a quantidade de fármaco incorporado aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco, do tensoativo e do polímero utilizados (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os altos valores de EE neste trabalho se devem ao fato de que o método empregado no preparo das nanopartículas ser adequado para fármacos altamente hidrofóbicos, como o sulfametoxazol e a trimetoprima, por causa de sua baixa solubilidade aquosa (BRASIL, 2019). Além disso, esses resultados podem sugerir uma boa incorporação dos fármacos e do polímero. O uso da PCL é interessante para o preparo de sistemas de liberação controlada em razão de sua degradação mais lenta e maior estabilidade (FERREIRA, 2015). Recentemente, Liu *et al.* (2020) relatou diversos estudos de nanopartículas poliméricas carregadas com fármacos hidrofóbicos evidenciando a importância de nanocarregadores poliméricos para a entrega desses fármacos. Uma EE acima de 97% foi verificada em nanocápsulas de PCL contendo alfa

tocoferol (KHAYATA *et al.*, 2012). Nanopartículas poliméricas contendo β -caroteno mostraram uma EE de 86,3 a 93,6% (FU *et al.*, 2018). De fato, apesar de não serem descritos na literatura trabalhos para os fármacos deste estudo, o método de nanoprecipitação aplicado se mostrou satisfatório no preparo das nanopartículas constituídas de PCL contendo sulfametoxazol e trimetoprima.

Com os resultados do delineamento fatorial, das análises de variância (ANOVA) realizadas e após estes resultados da eficiência de encapsulação, as formulações de número 1 e 8 foram escolhidas para prosseguimento do estudo. Os resultados da caracterização dessas nanopartículas mostraram-se satisfatórios, sendo que a formulação 1 apresentou diâmetro de 209 nm, IP de 0,227 e PZ de -29,1 mV; e a formulação 8 apresentou diâmetro de 233,3 nm, IP de 0,185 e PZ de -31,0 mV. Adicionalmente, apresentaram EE elevadas como 91,45% para sulfametoxazol e 96,26% para trimetoprima na formulação 1 e EE de 96,05% e 97,46% para sulfametoxazol e trimetoprima, respectivamente, na formulação 8.

6.4 Estudo de biocompatibilidade in vitro

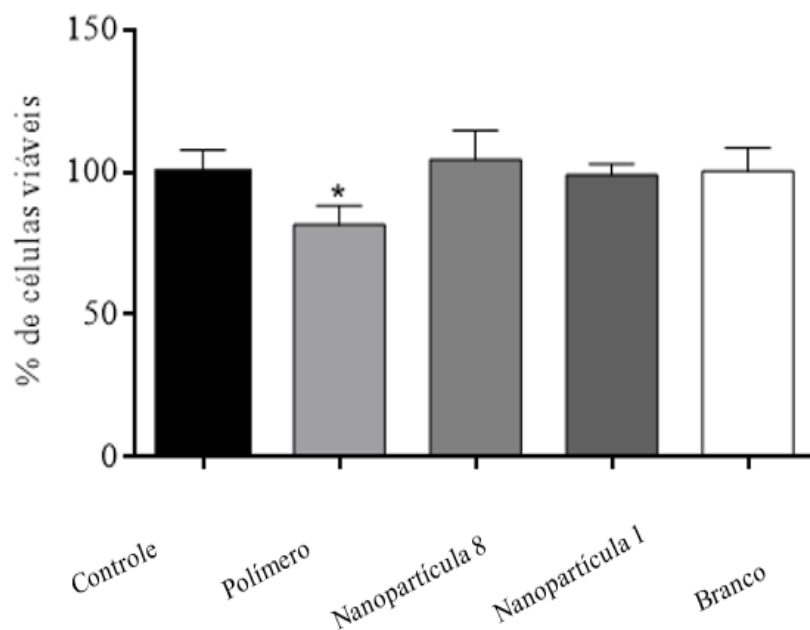
6.4.1 Ensaio com MTT

Um sal de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) foi utilizado para desenvolver um ensaio quantitativo colorimétrico que detecta células vivas, que geram um sinal dependente do grau de ativação das células. Este método pode ser usado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação. As vantagens do ensaio colorimétrico são sua rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

Em um ensaio colorimétrico é interessante utilizar um substrato incolor e que seja usado somente pelas células vivas a fim de se obter um produto colorido. No ensaio de MTT é utilizado o brometo de 3-(4,5(dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) que forma cristais azuis escuros de formazan ao ser incubado com células viáveis. O sal de tetrazólio é clivado nas mitocôndrias ativas evidenciando que a reação ocorre apenas em células com mitocôndrias viáveis (MOSMANN, 1983; RAMÍREZ RIVERA, 2018).

Na Figura 9 estão representados os resultados obtidos para este estudo.

Figura 9. Viabilidade das células frente às nanopartículas 1 e 8, polímero puro e nanopartículas não incorporadas de fármacos (branco).



Fonte: Autoria própria.

As formulações 1 e 8 e nanopartículas não incorporadas de fármacos (branco) apresentaram resultados semelhantes quando comparados ao controle, enquanto o polímero apresentou menor viabilidade que o grupo controle ($p \leq 0,05$). Observou-se que as nanopartículas representadas pelas formulações 1 e 8 não foram capazes de causar efeitos sobre a viabilidade das células ARPE-19 em 24 horas ($p < 0,05$). Fiscella *et al.* (1988) relata sobre a segurança da associação de sulfametoxazol e trimetoprima quando administrada por via intravítrea. Dois estudos recentes (CHOUDHURY *et al.* 2015; SOUZA *et al.* 2018) sobre a administração de antibióticos intravítreos mostraram que a aplicação intravítrea de sulfametoxazol e trimetoprima associada a outro fármaco, a dexametasona, melhorou a acuidade visual da maior parte dos pacientes bem como reduziu a inflamação intraocular. Estes dados corroboram com os resultados preliminares deste ensaio que sugerem que as nanopartículas não eram tóxicas às células. Isso representa uma vantagem destas formulações intraoculares destinadas à administração direta na cavidade vítrea para atingir as lesões toxoplásmicas.

6.4.2 Ensaio de migração celular

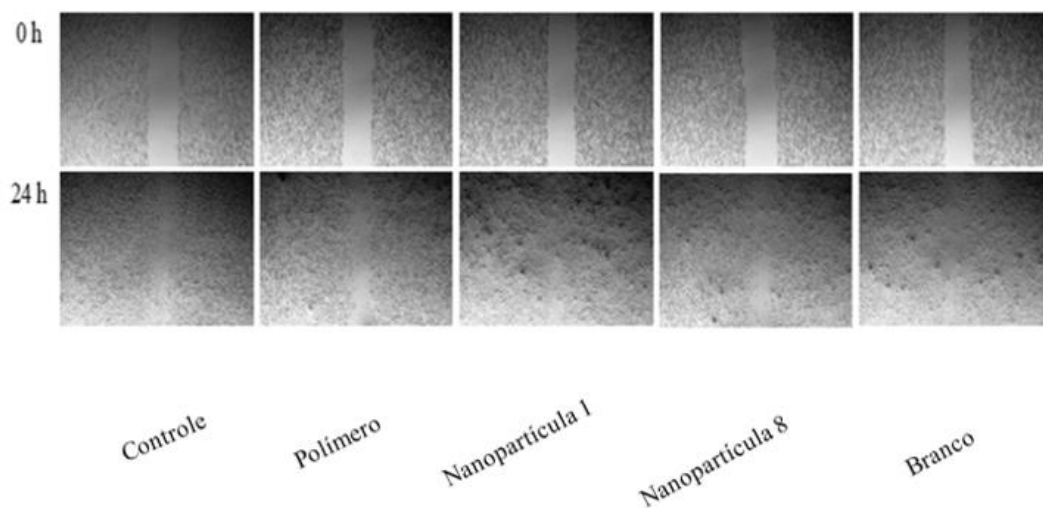
O ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* é um método simples, econômico e bem desenvolvido para estudar a migração celular. Nesta metodologia, uma fenda, também

denominada “arranhão”, é gerada em uma monocamada de células confluentes, e a taxa de fechamento da ferida e a migração celular podem ser quantificadas em vários períodos de tempo. Essa abordagem é muito comum para simular ferimentos em um tecido (LIANG; PARK; GUAN, 2007; ALMEIDA *et al.* 2019).

A linhagem celular escolhida para este estudo foi as células humanas epiteliais pigmentares da retina (células ARPE-19). De acordo com Carr *et al.* (2011), essa linhagem *in vitro* tem capacidade de diferenciar-se para gerar novos tipos de células retiniais, caso porventura ocorra uma lesão.

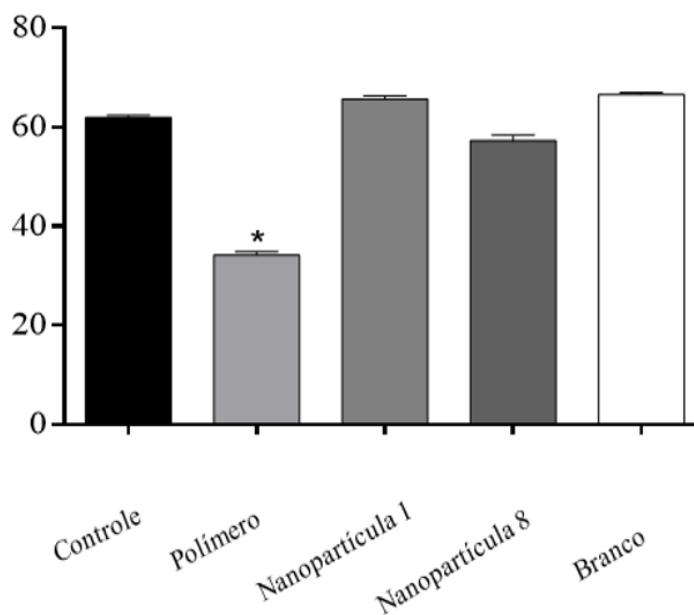
Para determinar a taxa de migração celular pelo ensaio de cicatrização de feridas as células foram plaqueadas e tratadas por 24 horas. As imagens foram capturadas antes do tratamento (tempo 0) e após 24 horas de tratamento e comparadas com o controle negativo. Uma resposta de migração celular foi observada para todos os materiais estudados. Na Figura 10 estão representadas as fotos referentes ao controle e tratamentos do ensaio de migração celular e no gráfico (Figura 11) a porcentagem do fechamento *in vitro* da área da ferida.

Figura 10. Imagem microscópica do ensaio de cicatrização de feridas no período inicial e no período final de 24 horas, referentes ao grupo controle e aos quatro materiais experimentais.



Fonte: Autoria própria.

Figura 11. Porcentagem do fechamento *in vitro* da área de ferida após 24 horas de tratamento.



Fonte: Autoria própria.

No período de 24 horas, os resultados das formulações 1 e 8 e as nanopartículas sem fármacos (branco) foram semelhantes ao grupo controle, enquanto o polímero apresentou menor porcentagem da taxa de migração celular que o controle ($p \leq 0,05$). A formulação 1 apresentou a maior taxa de migração celular e fechamento total da área, juntamente com o branco. A formulação 8 apresentou o segundo melhor resultado, não impedindo a migração. O polímero apresentou um resultado muito abaixo quando comparado ao grupo controle e aos demais tratamentos. Esse resultado sugere que as nanopartículas podem fazer com que as células respondam ao processo de migração, propiciando então o fechamento total de uma lesão. Apesar de não serem encontrados na literatura testes recentes de toxicidade *in vitro* para os fármacos sulfametoxazol e trimetoprima, os dados obtidos neste ensaio corroboraram com aqueles descritos anteriormente pelo teste de citotoxicidade sugerindo que as nanopartículas foram biocompatíveis quando em contato com as células oculares.

7. CONCLUSÃO

Diversos estudos relatam sobre os fatores limitantes em relação ao tratamento da toxoplasmose ocular e os desafios quanto à terapia para que se possa garantir a completa cicatrização da lesão, minimizar os efeitos adversos bem como a taxa de recorrência da doença. Os resultados apresentados durante este estudo são sugestivos de que os sistemas nanoparticulados desenvolvidos contribuem para a liberação dos fármacos diretamente no local de ação, sendo esta uma alternativa às limitações da terapêutica convencional. O planejamento fatorial 2^3 pode ser considerado uma ferramenta importante para avaliar a influência dos fatores que permitem caracterizar as nanopartículas. Por meio da análise do diâmetro de partícula, IP, PZ e EE foi possível selecionar nanopartículas que apresentaram diâmetro compatível à aplicação intraocular, IP que indica a homogeneidade do diâmetro, valores de PZ que demonstram a estabilidade da formulação e os altos valores da EE que indicam a escolha apropriada do nanocarreador desenvolvido bem como do método empregado. Além disso, com os resultados obtidos no estudo de biocompatibilidade *in vitro*, conclui-se que as nanopartículas poliméricas não foram citotóxicas às células, pois as mesmas mostraram-se viáveis. Finalmente, as nanopartículas foram desenvolvidas, caracterizadas e biocompatíveis quando em contato com as células oculares o que possibilita a escolha de formulações destinadas ao tratamento localizado da toxoplasmose ocular.

8. REFERÊNCIAS

- ALDAY, P. H.; DOGGET, J. S. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and status. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 273-293, 2017.
- ALMEIDA, V. M. et al Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura in vitro. **J Bras Patol Med Lab**, v. 55(6), p. 606-619, 2019.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Aulton delineamento de formas farmacêuticas**. Tradução Francisco Sandro Menezes. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 1713 p.
- BALEST, Aiessa Pagliarini. **Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (Caryocar brasiliense Camb)**. 2013. 62p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade de Brasília, Ceilândia, 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**. 8 ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. **Monografias: Insumos Farmacêuticos e Especialidades**. 6^oed, v. 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.
- CARR, A. J. et al. The expression of retinal cell markers in human retinal pigment epithelial cells and their augmentation by the synthetic retinoid fenretinide. **Mol Vis.**, v. 17, p. 1701-1715, 2011.
- CASOY, J. et. al. Effectiveness of Treatments for Ocular Toxoplasmosis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 28(2), p. 249-255, 2020.
- CAZO, N. A. *et al*. Nanopartículas de poli-ε-caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. **Orbital Elec. J. Chem.**, v. 4, n. 2, p. 54-76, 2012.
- CHOUDHURY, H. et al. The Role of Intravitreal Trimethoprim/ Sulfamethoxazole in the Treatment of Toxoplasma Retinochoroiditis. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina**, v. 46, p. 137-140, 2015.

DANTAS, Marcia Macedo Lima. **Frequência da infecção ocular por *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) e outros agentes infecciosos em pacientes atendidos no laboratório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, no período de janeiro de 2010 a agosto de 2015.** 2017. 104 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

DARDÉ, M. L.; FOUGERE, E.; BUXERAUD, J. Les médicaments de la toxoplasmose. **Actualités Pharmaceutiques**, v. 57, p. 22-26, 2018.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, New York, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

FELIX, João Paulo Fernandes. **Influência do sulfametoxazol-trimetoprim na recorrência de retinocoroidite por *Toxoplasma gondii*.** 2015. 85 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

FERNANDES-CUNHA, G. M. et al. Anti-Toxoplasma activity and impact evaluation of lyophilization, hot molding process, and gamma-irradiation techniques on CLH-PLGA intravitreal implants. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 27, p. 1-10, 2016.

FERREIRA, Andrea Granada. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de β ciclodextrina-b-poli(ϵ -caprolactona) e maltoheptaose7-b-poli(ϵ -caprolactona) visando a incorporação e liberação tópica de fármacos.** 2015. 172 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

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

FISCELLA, R. et al. Intravitreal toxicity of cotrimoxazol. **Ophthalmic Surg**, v. 19 (1), p. 44-46, 1988.

FU, Z. N. et al. Size control of drug nanoparticles stabilized by mPEG-b-PCL during flash nanoprecipitation. **Colloid Polym. Sci.**, v. 296(5), p. 935–940, 2018.

GRABNAR, P. A.; KRISTL, J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. **J Microencapsul**, v. 28(4), p. 323-335, 2011.

KHAYATA, N. et al. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **Int. J. Pharm.**, v. 423(2), p. 419–427, 2012.

KONSTANTINOVIC, N. et al. Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives. **Food and Waterborne Parasitology**, 2019.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat. Protoc.**, v. 2(2), p. 329-33, 2007.

LIU, Y. et al. Formulation of nanoparticles using mixing-induced nanoprecipitation for drug delivery. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 59, p. 4134–4149, 2020.

MALAQUIAS, D. P. et al. **Composições de nanoesferas de PHB/PCL contendo estatinas, processo de preparação e uso.** Titulares: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; Universidade Federal de Minas Gerais. BR 10 2016 021926 4 A2, Depósito: 23 set. 2016, Concessão: 02 mai. 2018.

MELO, C. M. et al. Amphotericin B-loaded Eudragit RL100 nanoparticles coated with hyaluronic acid for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Carbohydrate Polymers**, 2019.

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

MENDES, Roberta Almeida. **Cimentos endodônticos biocerâmicos: Avaliação da citotoxicidade, bioatividade e migração celular em cultura de células-tronco.** 2019. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

MORAIS, F.B.; ARANTES, T. E. F. E.; MUCCIOLI, C. Current Practices in Ocular Toxoplasmosis: A Survey of Brazilian Uveitis Specialists. **Ocular Immunology & Inflammation**, v. 26(2), p. 317-323, 2018.

MORALES-CRUZ, M. et al. Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. **Results Pharma Sci**, v. 2, p. 79-85, 2012.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

- NEVES, D. P et al. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 494 p.
- NGUYEN, A. M. et al. Clinical and etiological aspects of uveitis: a retrospective study of 121 patients referred to a tertiary centre of ophthalmology (in French). **Rev Méd Interne**, v. 32, p. 9–16, 2011.
- NICOLAS, J. et al. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. **Chem Soc Rev**, v. 42, p. 1147-1235, 2013.
- NOGUEIRA, V; LIVERANI, M. **Toxoplasmose Ocular**. Revista da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia, v. 38, n. 4, p. 225-232, 2014.
- OPREMCAK, E.M.; SCALES, D. K.; SHARPE, M. R. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for ocular toxoplasmosis. **Ophthalmology**, v. 99, p. 920–925, 1992.
- OZGONUL C.; BESIRLI C. Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. **Ophthalmic Res**, v. 57, n. 1-12, 2017.
- RAMÍREZ RIVERA, Luis Miguel. **Síntese e caracterização de nanoestruturas superparamagnéticas baseadas em óxidos de ferro e glicosaminoglicanos**. 2018. 109 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- RIVAS, C. J. M. et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532(1), p. 66-81, 2017.
- RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 64–70, 2018.
- SADAT, S. M. A.; JAHAN, S.; HADDADI, A. Effects of Size and Surface Charge of Polymeric Nanoparticles on in Vitro and in Vivo Applications. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 7(2), p. 91-108, 2016.
- SANTOS, M. C; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Quimiometria como ferramenta analítica para definição das condições de ensaio da enzima peroxidase de soja. **Eclética Química**, p. 121-131, 2010.

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.

SILVA, Fabiana Ernestina Barcellos da. **Determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em formulações farmacêuticas por ATR-FTIR e DRIFTS empregando calibração multivariada**. 2008. 131 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

SOHEILIAN, M. et al. Prospective randomized trial of trimethoprim/sulfamethoxazole versus pyrimethamine and sulfadiazine in the treatment of ocular toxoplasmosis. **Ophthalmology**, v. 112, p. 1876-1882, 2005.

SOUZA, C. E. et al. Intravitreal Injection of Sulfamethoxazole and Trimethoprim Associated with Dexamethasone as an Alternative Therapy for Ocular Toxoplasmosis. **Ocul Immunol Inflamm.**, v. 26(7), p. 1041-1044, 2018.

SURI, R.; BEG, S.; KOHLI, K. Target strategies for drug delivery bypassing ocular barriers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2019.

TAVARES, Walter. **Antibióticos e Quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014. 746 p.

TSAI, C.H. et al. Ocular drug delivery: role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application. **Int J Mol Sci**, v. 19(9), p. 2830, 2018.

VIEIRA, R. C. et al. Psicofísica visual em caso de toxoplasmose ocular congênita. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 77 (5), p. 292-295, 2018.

WENG, Y. et al. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. **Acta Pharm Sin B.**, v. 7(3), p. 281-291, 2017.

YETISGIN, A. A. et al. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. **Molecules**, v. 25(9), p. 2193, 2020.