



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



CAROLINA RODRIGUES INÁCIO

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA E VIABILIDADE CELULAR
DAS MATRIZES POLIMÉRICAS DE PEG 4000 E DERIVADOS
INCORPORADOS COM CETOCONAZOL**

OURO PRETO
2022

CAROLINA RODRIGUES INÁCIO

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA E VIABILIDADE CELULAR
DAS MATRIZES POLIMÉRICAS DE PEG 4000 E DERIVADOS
INCORPORADOS COM CETOCONAZOL**

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.

OURO PRETO
2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

I35e Inácio, Carolina Rodrigues.

Estudo de liberação controlada e viabilidade celular das matrizes poliméricas de PEG 4000 e derivados incorporados com cetoconazol.. [manuscrito] / Carolina Rodrigues Inácio. - 2022.

51 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Martins Rebello dos Santos.

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

1. Liberação Controlada de Fármacos. 2. Sobrevivência Celular. 3. Polímeros. 4. Cetoconazol. 5. Polietilenoglicóis. I. Santos, Viviane Martins Rebello dos. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.014

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Rodrigues Inácio

Estudo de Liberação Controlada e Viabilidade Celular das Matrizes Poliméricas de PEG 4000 E DERIVADOS Incorporados com Cetoconazol

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 21 de junho de 2022

Membros da banca

[Doutorado] - Viviane Martins Rebello dos Santos - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto.

[Doutorado] - Kátia Monteiro Novack - Universidade Federal de Ouro Preto.

[Mestrando] - Lucas Resende Dutra Sousa - Universidade Federal de Ouro Preto.

Viviane Martins Rebello dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 21/06/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Martins Rebello dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/06/2022, às 20:46, 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 **0348645** e o código CRC **6A835425**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que abençoou minha jornada.

Aos meus pais, Carmem e Roberto, pelo carinho e todo o suporte, para que eu conseguisse realizar esta conquista.

Às minhas orientadoras Katia e Viviane pelas orientações e oportunidades acadêmicas.

Ao Lucas, pelas orientações.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Ouro Preto e a Escola de Farmácia pela formação acadêmica de qualidade.

RESUMO

Nos últimos anos, materiais poliméricos vêm ganhando destaque nos estudos de sistemas de liberação controlada para a obtenção de melhorias na administração dos fármacos. Esses sistemas apresentam inúmeras vantagens em comparação aos sistemas de liberação convencionais, como a manutenção constante da concentração sanguínea de um determinado fármaco, maior biodisponibilidade, redução de efeitos adversos, menor número de dosagens requeridas, proporcionando maior adesão do paciente ao tratamento. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo, sintetizar matrizes poliméricas capazes de promover a liberação controlada do fármaco cetoconazol, com a finalidade de minimizar seus efeitos adversos. Foram realizadas reações de modificações de acetilação, halogenação, esterificação seguida de hidrólise e alquilação nas cadeias do polímero polietilenoglicol 4000 (PEG 4000). Posteriormente o fármaco foi incorporado nas matrizes poliméricas. O polímero PEG 4000 e derivados e incorporados com o fármaco foram caracterizados por microscopia de força atômica (MFA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e potencial zeta (PZ). Os ensaios de liberação controlada em solução tampão de pH 7,3 foram realizados no intervalo de 0 a 360 min, utilizando a espectrofotometria UV-vis para quantificar o cetoconazol liberado. Por fim, o ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) . As técnicas de (MFA) e (MEV) demonstraram que o fármaco exerce influência nas matrizes poliméricas, indicando que as reações de incorporação do fármaco foram satisfatórias. O potencial zeta das micropartículas de PEG 4000 e derivados e incorporados sugerem que as superfícies das micropartículas apresentaram baixa carga eletrostática. Com relação a liberação controlada, todos os polímeros incorporados obtiveram o perfil adequado de liberação controlada em pH 7,3. Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram satisfatórios, pois os polímeros não foram tóxicos para as células.

Palavras-chave: Cetoconazol, Liberação controlada, Polietilenoglicol 4000, Viabilidade Celular.

ABSTRACT

In recent years, polymeric materials have gained prominence in studies of controlled drug delivery systems to obtain improvements in drug administration. Controlled drug delivery systems offer numerous advantages over conventional dosage forms, including improved therapeutic effects, minimized fluctuation of drug concentrations and maintenance of blood levels within a desired range, improved bioavailability, reduced side effect, reduced dosage frequency and increased patient compliance. The present work aimed to synthesize polymeric matrices capable of promoting the controlled release of the drug ketoconazole, in order to minimize its adverse effects. Polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) had its chain modified by organic reactions, such as acetylation, halogenation, esterification followed by hydrolysis and alkylation. Posteriorly were also incorporated with ketoconazole. PEG 4000 and derivatives and incorporated with the drug were characterized by atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM) and Zeta Potential (ZP). The controlled release in pH 7.3 was performed in the time from 0 to 360 min using the Ultraviolet Spectroscopy to quantify ketoconazole released from the polymer matrix for these 6 hours. Finally, cell viability was determined by the MTT reduction method 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. The (AFM) and (SEM) techniques demonstrated that the drug exerts an influence on the polymeric matrices, indicating that the drug incorporation reactions were satisfactory. The zeta potential values suggest that the microparticles of PEG 4000 and derivatives and incorporated with the drug showed a low electrostatic charge. Regarding controlled release, the incorporated polymers obtained the appropriate controlled release profile at pH 7.3. The results of cell viability were satisfactory, the polymers were non-toxic to cells.

Keywords: Controlled release, Cell viability, Ketoconazole, Polyethylene glycol 4000.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação das concentrações de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistema de liberação controlada (b).....	18
Figura 2: Limitações dos sistemas de liberação convencionais	19
Figura 3: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	21
Figura 4: (A) microesfera- o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) microcápsula- o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante (polímero)	22
Figura 5: Representação da estrutura do hidrogel	23
Figura 6: Estrutura química do Polietilenoglicol (PEG)	24
Figura 7: Estrutura química do fármaco cetoconazol.....	25
Figura 8: Representação esquemática da alteração da composição e da organização da membrana celular e o mecanismo de ação dos azóis sobre a síntese do ergosterol	27
Figura 9: Síntese dos derivados de PEG 4000.....	30
Figura 10: Aspecto físico dos polímeros. PEG 4000 (A), PEG 4000 ACET (B), PEG 4000 HIDROL (C), PEG 4000 ETI (D), PEG 4000 HAL (E); PEG 4000 INCORP (F), PEG 4000 ACET INCORP (G), PEG 4000 HIDROL INCORP (H), PEG 4000 ETI INCORP (I), PEG 4000 HAL INCORP (J)	36
Figura 11: Microscopia de força atômica dos polímeros. PEG 4000 (a), PEG 4000 ACET (b), PEG 4000 HIDROL (c), PEG 4000 ETI (d), PEG 4000 HAL (e), PEG 4000 INCORP (f), PEG 4000 ACET INCORP (g), PEG 4000 HIDROL INCORP (h), PEG 4000 ETI INCORP (i), PEG 4000 HAL INCORP (j)	37
Figura 12: Fotomicrografia dos polímeros. PEG 4000 (A), PEG 4000 ACET (B), PEG 4000 ETI (C), PEG 4000 HAL (D) e PEG 4000 HIDROL (E); polímeros incorporados: PEG 4000 INCORP (F), PEG 4000 ACET INCORP (G), PEG 4000 ETI INCORP (H), PEG 4000 HAL INCORP (I) e PEG 4000 HIDROL INCORP (J)	
Figura 13: Curva padrão do fármaco cetoconazol.....	40
Figura 14: Gráfico de liberação controlada dos polímeros incorporados em pH 7,3.....	41
Figura 15: Gráfico de viabilidade celular dos polímeros	42
Figura 16: Gráfico de viabilidade celular dos polímeros incorporados	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista representativa dos polímeros usados em sistemas de liberação controlada de fármacos.....	20
Tabela 2: Principais formulações farmacêuticas contendo cetoconazol comercializadas no Brasil.....	26
Tabela 3: Potencial Zeta do PEG 4000 e derivados e incorporados. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata...	39

LISTA DE ABREVIACOES

CET- Cetoconazol

MFA – Microscopia de Força Atômica

PEG 4000- Polietilenoglicol 4000

PEG 4000 ACET- Polietilenoglicol 4000 Acetilado

PEG 4000 ETI- Polietilenoglicol 4000 Etilado

PEG 4000 HAL- Polietilenoglicol 4000 Halogenado

PEG 4000 HIDROL- Polietilenoglicol 4000 Hidrolisado.

PEG 4000 INCORP- Polietilenoglicol 4000 incorporado ao Cetoconazol.

PEG 4000 ACET INCORP- Polietilenoglicol 4000 Acetilado incorporado ao Cetoconazol

PEG 4000 ETI INCORP- Polietilenoglicol Etilado incorporado ao Cetoconazol

PEG 4000 HAL INCORP- Polietilenoglicol Halogenado incorporado ao Cetoconazol

PEG 4000 HIDROL INCORP- Polietilenoglicol 4000 Hidrolisado incorporado ao Cetoconazol

PZ- Potencial Zeta

SLC- Sistemas de liberação controlada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. REVISÃO DA LITERATURA	18
4.1 Sistemas de liberação controlada.....	18
4.2 Polímeros para o uso na liberação controlada	19
4.2.1 Nanopartículas	20
4.2.2 Micropartículas	22
4.2.3 Hidrogéis	23
4.3 Polietilenoglicol.....	24
4.4 Cetoconazol	25
4.4.1 Mecanismo de ação	27
4.4.2 Atividade antifúngica	28
4.4.3 Efeitos Adversos.....	29
5. METODOLOGIA	30
5.1 Materiais utilizados	30
5.2 Síntese dos polímeros	30
5.2.1 Reação de acetilação (PEG 4000 ACET).....	30
5.2.2 Reação de alquilação (PEG 4000 ETI).....	31
5.2.3 Reação de halogenação (PEG 4000 HAL)	31
5.2.4 Reação de esterificação seguida de hidrólise (PEG 4000 HIDROL)	31
5.3 Teste de solubilidade	32
5.4 Incorporação do cetoconazol aos polímeros modificados	32
5.5 Caracterizações	33
5.5.1 Microscopia de força atômica (MFA)	33
5.5.2 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)	33

5.5.3 Determinação do Potencial Zeta.....	33
5.6 Análise estatística	33
5.7 Solução tampão	33
5.7.1 Solução Tampão pH 7,3	34
5.8 Curva padrão	34
5.9 Liberação Controlada	34
5.10 Ensaio de Viabilidade Celular	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1 Síntese dos polímeros	36
6.2 Teste de solubilidade	36
6.3 Caracterizações.....	37
6.3.1 Microscopia de força atômica (MFA)	37
6.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
6.3.3 Potencial Zeta	39
6.4 Curva Padrão	40
6.5 Liberação controlada	41
6.6 Ensaio de viabilidade celular.....	42
7. CONCLUSÃO.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

Polímeros são macromoléculas compostas por unidades de repetição denominadas meros que são ligadas por ligação covalente e podem ser classificados em homopolímeros ou copolímeros. Os homopolímeros são aqueles formados por uma única unidade repetitiva e os copolímeros são aqueles que possuem mais de um mero em sua estrutura (CANEVAROLO JR., 2006).

O Polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) é um homopolímero sintético formado por subunidades de óxido de etileno (FRUITIER-PÖLLOTH, 2005). Possui excelentes propriedades, incluindo a solubilidade em água, biocompatibilidade, boa tolerância (THI et al., 2020), possui modificação simples do grupo final, além de ser não imunogênico e atóxico (LIU et al., 2020). Devido a essas propriedades químicas, é comumente empregado no sistema de liberação controlada de fármacos (BARKAT et al., 2018).

Para este trabalho, o fármaco selecionado foi o cetoconazol, um antifúngico imidazólico utilizado no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas (VENISHETTY et al., 2011). Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da enzima 14- α -desmetilase. Tal inibição prejudica a biossíntese do ergosterol, que é o componente principal do esterol das membranas plasmáticas fúngicas, levando ao acúmulo de precursores 14- α -metilesteróis, inibindo o crescimento e replicação dos fungos (MAERTENS, 2004).

As formulações tópicas com cetoconazol, não atingem a circulação sistêmica, sendo seguras e eficazes para condições dermatológicas, sem efeitos adversos significativos. Desta forma, o cetoconazol serve como tratamento de primeira linha para pitiríase versicolor e dermatite seborreica (GUPTA; LYONS; 2015).

Entretanto, o cetoconazol, pela via oral, considerando a forma farmacêutica comprimidos, pode provocar efeitos adversos como hepatotoxicidade, com destaque para os casos mais graves, e interferência na regulação endócrina. Portanto, é recomendado como tratamento de segunda linha para as micoses sistêmicas mais graves, quando alternativas viáveis não estiverem disponíveis (GUPTA; LYONS; 2015).

Na terapia medicamentosa convencional, a concentração plasmática do fármaco não se mantém dentro da faixa terapêutica, por um período prolongado. Já na liberação controlada, a concentração do agente ativo permanecerá constante no plasma sanguíneo, pois, a liberação do fármaco ocorrerá a uma velocidade praticamente constante (LYRA et al., 2007).

Os sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, tais como: aumento da eficácia terapêutica através da manutenção de níveis dos fármacos dentro da faixa terapêutica, minimiza ou elimina efeitos adversos, redução do número de administrações diárias, em relação ao sistema convencional; administração noturna pode ser evitada e conseqüentemente melhor será a adesão do paciente ao tratamento (KUSHAL et al., 2013).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo desenvolver matrizes poliméricas a partir do PEG 4000 que sejam capazes de carrear e liberar de forma controlada o fármaco cetoconazol com a finalidade de diminuir ou até mesmo anular seus efeitos adversos.

2. JUSTIFICATIVA

Os polímeros são materiais versáteis disponíveis para aplicações em diversas áreas, inclusive a farmacêutica. Desta forma, são amplamente empregados como carreadores em sistemas de liberação controlada (SLC), transportando o fármaco até o local de ação ou liberando pequenas doses de forma controlada ao longo do tempo.

Nas últimas décadas, nota-se que houve um aumento expressivo de pesquisas sobre (SLC). Isso pode ser atribuído pelas vantagens desses sistemas em comparação com os sistemas de liberação convencionais, como a diminuição dos efeitos adversos promovidos pelo fármaco e conseqüentemente maior adesão do paciente ao tratamento.

O polímero PEG 4000, do presente estudo, apresenta excelentes propriedades como solubilidade em água, biocompatibilidade, boa tolerância, além de ser não imunogênico e atóxico. Devido a tais propriedades, o polímero se torna tecnicamente viável para ser utilizado como veículo no (SLC).

O fármaco utilizado neste estudo é o cetoconazol (CET), um derivado imidazólico, utilizado para o tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da enzima 14- α -desmetilase. Tal inibição prejudica a biossíntese do ergosterol, impedindo o crescimento e replicação dos fungos.

O (CET) era um tratamento sistêmico disponível para uma ampla gama de infecções fúngicas. Entretanto, o uso de comprimidos orais de (CET) foi limitado, devido ao risco de lesão hepática e outros efeitos adversos severos. Desta forma, torna-se importante a realização de estudos de novas formulações, principalmente de liberação controlada, com a finalidade de minimizar os efeitos adversos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Desenvolver matrizes poliméricas a partir do PEG 4000 que sejam capazes de carrear e liberar de forma controlada o fármaco cetoconazol com a finalidade de minimizar seus efeitos adversos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Realizar as reações de acetilação, esterificação seguida de hidrólise, alquilação e halogenação na cadeia do polímero PEG 4000.
- Realizar incorporações do fármaco cetoconazol nas matrizes poliméricas.
- Avaliar a influência da incorporação do fármaco cetoconazol nas matrizes poliméricas por Microscopia de Força Atômica (MFA).
- Avaliar todas as matrizes poliméricas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Determinar o Potencial Zeta das amostras de PEG 4000 e derivados e incorporados com cetoconazol por medidas de mobilidade eletroforética (Eletroforese) usando Zetasizer (Malvern, modelo Zetasizer série Nano, Nano ZS).
- Realizar o ensaio de liberação controlada do fármaco cetoconazol através das matrizes poliméricas.
- Analisar o perfil da curva de liberação para que esteja dentro dos requisitos de uma liberação controlada.
- Avaliar a viabilidade celular do polímero PEG 4000 e derivados e incorporados com o cetoconazol.

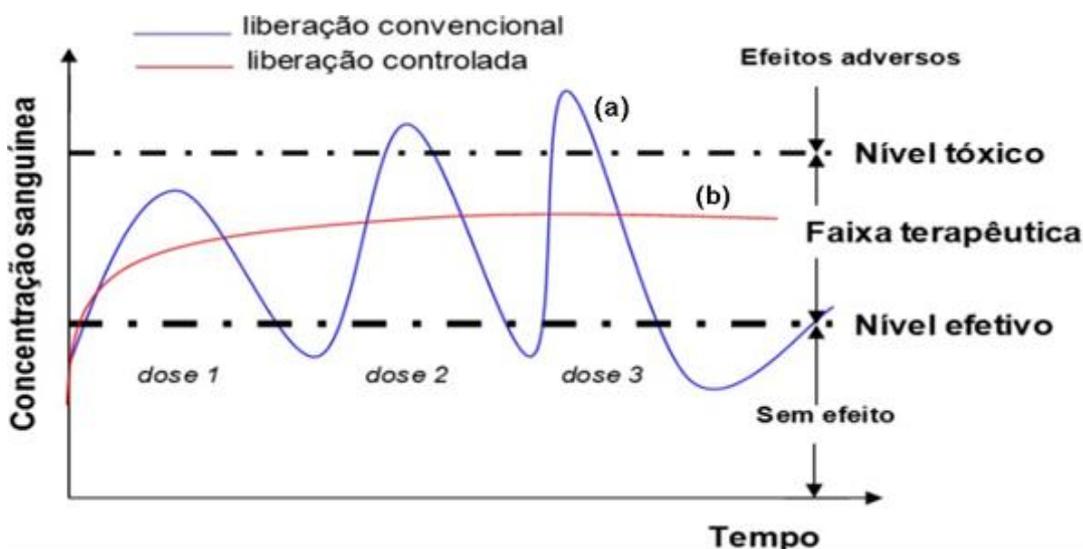
4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Sistemas de liberação controlada

Por definição, Sistema de Liberação Controlada (SLC) ou Drug Delivery System (DDS) é um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas in vivo, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos. (VILLANOVA; OREFICE; CUNHA, 2010). A aplicação de (SLC) é uma estratégia central para aumentar a biodisponibilidade, eficácia terapêutica e segurança do fármaco (SINGH et al., 2019).

Na figura 1 está representado um comparativo entre o método convencional de multidosagem e o sistema de liberação controlada. No primeiro caso, a curva (a), representada em azul, indica que a liberação convencional de fármaco proporciona variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo resultar em baixa eficácia do medicamento ou ocasionar intoxicação. Em contraste, a curva (b), representa os sistemas de liberação controlada que são projetados para melhorar a cinética de liberação do fármaco. A concentração do fármaco nível no plasma sanguíneo aumenta e então permanece constante na faixa efetiva, entre níveis mínimos efetivos e máximos desejados (HUYNH; LEE, 2014).

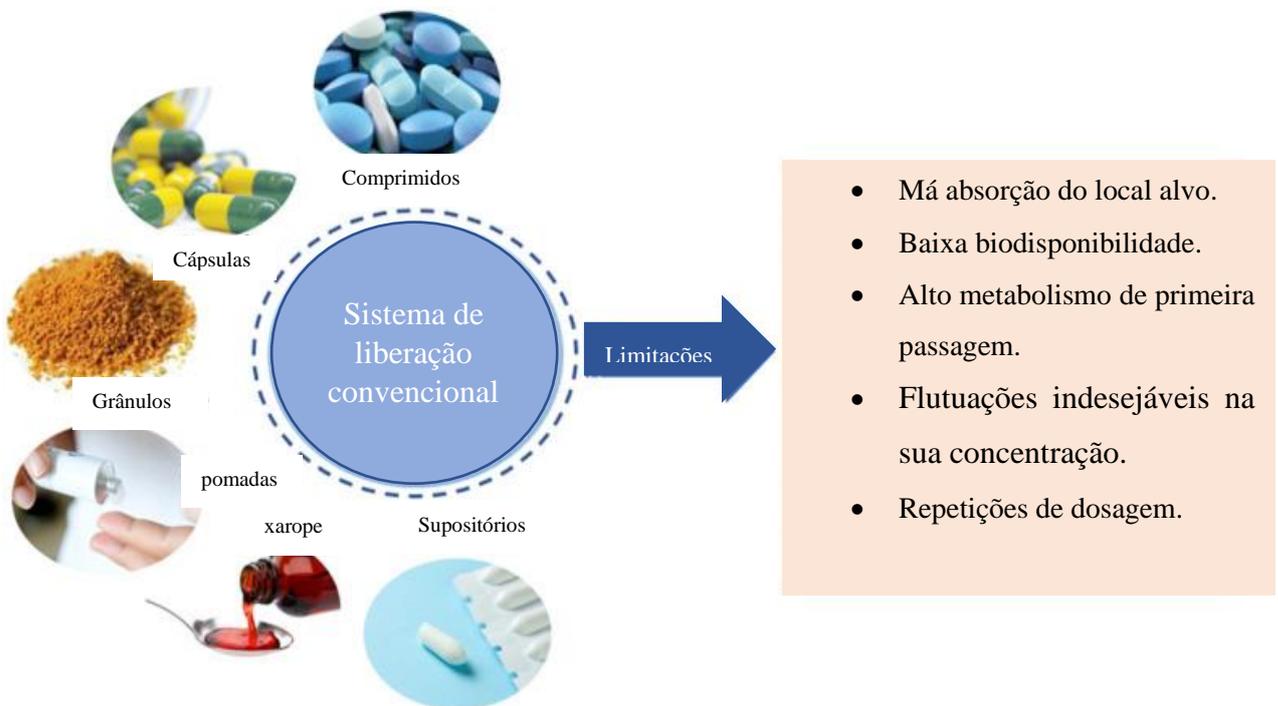
Figura 1: Comparação das concentrações de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistema de liberação controlada (b).



Fonte: (REBITSKI, 2015).

Desta forma, os sistemas de liberação controlada apresentam vantagens quando comparados as formas farmacêuticas convencionais, tais como: manutenção do nível terapêutico com baixa oscilação, impede níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos, evita subníveis terapêuticos, possibilitam maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência, proporcionam maior comodidade pela diminuição do número de administrações diárias, facilitando a adesão do paciente ao tratamento (LYRA et al., 2007).

Figura 2: Limitações dos sistemas de liberação convencionais.



Fonte: Adaptado de (ADEPU; RAMAKRISHNA, 2021).

4.2 Polímeros para o uso na liberação controlada

As pesquisas sobre a utilização de materiais poliméricos em sistemas de liberação controlada têm progredido nas últimas duas décadas, através de abordagens multidisciplinares que buscam melhorar o índice terapêutico e a biodisponibilidade de fármacos (SUNG; KIM, 2020).

Esses materiais colocam-se em posição de destaque por causa da versatilidade estrutural que permite adequação em termos de propriedades para cada aplicação. A possibilidade de alterar os grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular das cadeias e modificar a superfície das partículas pode viabilizar o estabelecimento de algumas interações

específicas entre o polímero e o meio biológico (PEIXOTO, 2013). Dentre os principais sistemas de liberação poliméricos, em estudo atualmente, incluem as micropartículas, nanopartículas e os hidrogéis (MELO et al., 2012).

Tabela 1: Lista representativa dos polímeros usados em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Classificação	Polímero
Polímeros naturais	
Polímeros a base de proteínas	Colágeno, albumina, gelatina
Polissacarídeos	Agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextran, quitosana, ciclodextrinas
Polímeros sintéticos	
<i>Biodegradáveis</i>	
Poliéster	Poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(hidroxibutirato), poli(ϵ -caprolactona), poli(ácido β -málico), poli(dioxanonas)
Polianidrido	Poli(ácido sebácico), poli(ácido adípico), poli(ácido terftálico) e vários copolímeros
Poliâmidas	Poli(imino carbonatos), poliaminoácidos
Polímeros fosforosos	Polifosfatos, polifosfonatos, polifosfazenos
Outros	Poli(ciano acrilatos), poliuretanos, éster poliorto, Polidihidropirans, poliacetais
<i>Não biodegradáveis</i>	
Derivados de celulose	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropil metilcelulose
Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
Polímeros Acrílicos	Polimetacrilatos, poli(metilmetacrilato), poli hidro(etilmetacrilato)
Outros	Polivinilpirrolidona, etilvinilacetato, poloxameros, poloxaminas

Fonte: (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

4.2.1 Nanopartículas

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as

nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003).

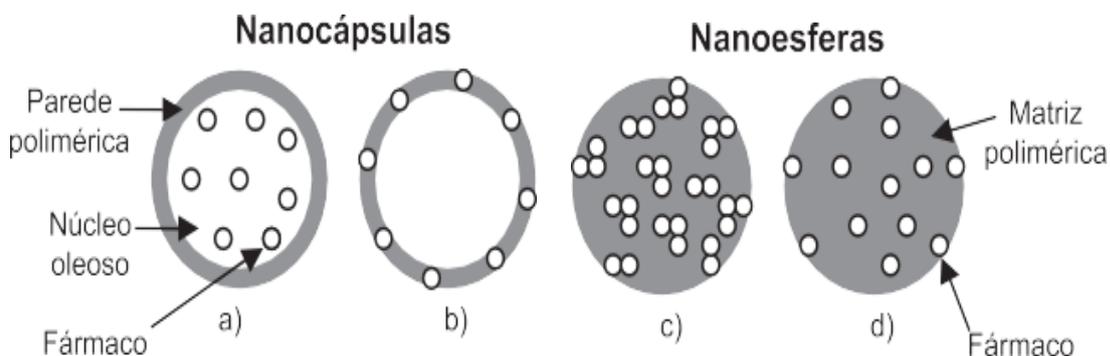
Os polímeros mais utilizados para esta aplicação são: polímeros naturais, como albumina, dextrano, hialuronato e quitosana e polímeros sintéticos como PLGA, PLA, policaprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG), acetato de polivinila (PVA), poli(cianoacrilato) (PCA), Poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (PHPMA) (LEE; YEO, 2015).

As vantagens da utilização de nanopartículas incluem a liberação controlada e/ ou prolongada da substância nelas encapsuladas, a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local da ação e o aumento da penetração intracelular (MELO et al., 2012).

Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos, principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Outra promissora aplicação das nanopartículas é a administração oftálmica de fármacos. As nanopartículas preparadas com polímeros muco-adesivos, como é o caso da quitosana, tendem a permanecer em contato com a mucosa ocular por um período mais longo e aumentar a biodisponibilidade de fármacos, além de reduzir a ocorrência de efeitos adversos devido à absorção sistêmica da fração da preparação drenada pelo ducto nasolacrimal (MATOS et al., 2015).

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

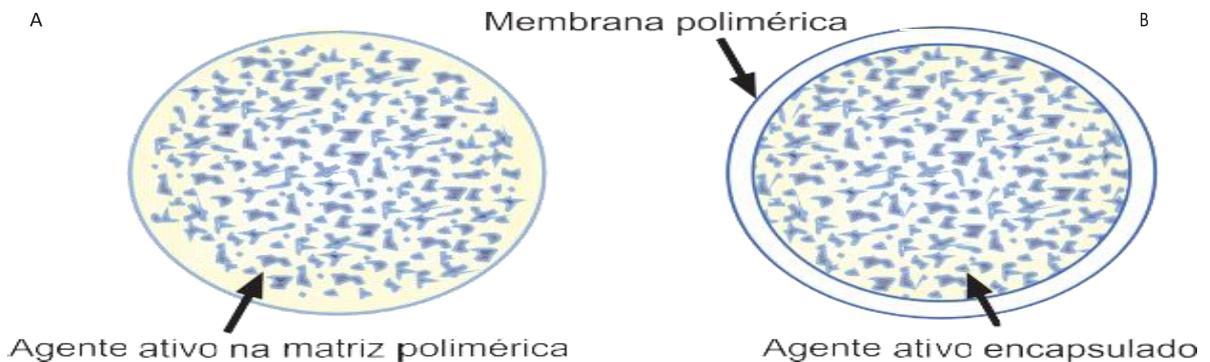


Fonte: (SCHAFFAZICK et al., 2003).

4.2.2 Micropartículas

As micropartículas apresentam diâmetro de 1 a 100 μm e são subdivididas em microesferas e microcápsulas, segundo a sua estrutura. São denominadas microesferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular. Já as microcápsulas são as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (SUAVE et al., 2006).

Figura 4: (A) microesfera- o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) microcápsula- o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante (polímero).



Fonte: (SUAVE et al., 2006).

Vários polímeros podem ser utilizados na produção de micropartículas e sua escolha depende da aplicação terapêutica requerida. Ao eleger o material a ser utilizado deve-se observar as características físico-químicas, como a viscosidade, higroscopicidade e biocompatibilidade (SEVERINO et al., 2011).

Para a obtenção de micropartículas, podem ser utilizados os polímeros como o poli(metacrilato de metila), o poli(álcool vinílico), a poliacrilamida, o polietilenoglicol, o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido lático) (PLA), os copolímeros do ácido lático e do ácido glicólico (PLGA) e a policaprolactona (PCL) (MENDES, 2011).

As micropartículas polímeras são amplamente empregadas para a veiculação de fármacos, proteínas e peptídeos. As vantagens obtidas com o uso das micropartículas poliméricas sintéticas são proteção do princípio ativo, mucoadesão; gastrorresistência; reprodutibilidade e o fracionamento da dose, apresentando-se como fatores responsáveis para melhorar a biodisponibilidade dos fármacos e conseqüentemente, promovendo maior adesão do paciente ao tratamento (SEVERINO et al., 2011).

4.2.3 Hidrogéis

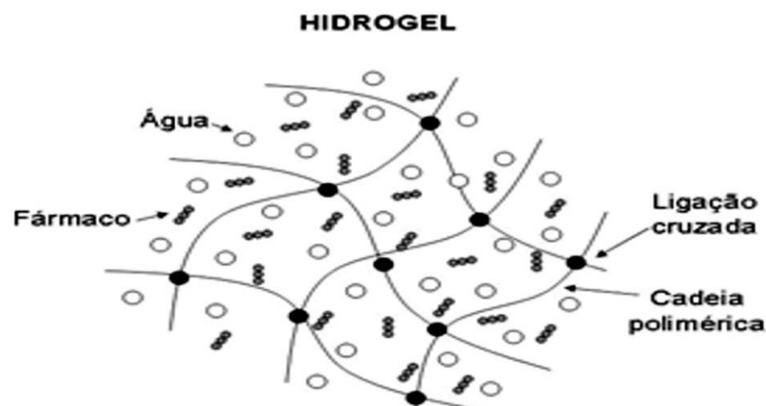
Os hidrogéis são redes tridimensionais e interligadas de polímeros solúveis em água. Abrangem uma ampla gama de composições químicas e propriedades físicas em massa. Esses sistemas podem ser formulados em uma grande variedade de formas físicas, incluindo formulações de depósito, micropartículas, nanopartículas, revestimentos e filmes (HOARE; KOHANE, 2008).

Os hidrogéis podem ser formados por polímeros naturais, tais como ácido hialurônico, alginato, quitosana; por polímeros naturais modificados, por exemplo dextrana reticulada, galactomanana metacrilatada; e por polímeros sintéticos, como poliacrilamida (PAAm), poli(hidroxietil metacrílico) (HEMA), entre outros (MOURA; RUBIRA; MUNIZ, 2008).

Ademais, apresentam uma estrutura altamente porosa que pode ser facilmente modelada pelo controle do número de ligações cruzadas e pela hidrofiliicidade do polímero. A porosidade permite a liberação de fármacos a uma taxa dependente do coeficiente de difusão das moléculas no hidrogel. A biodegradação ou dissolução desses sistemas pode ocorrer por via enzimática, hidrolítica ou dependente de modificações do meio (pH, temperatura ou campo elétrico) (LEE; YUK, 2007).

Em comparação com outros tipos de biomateriais, os hidrogéis têm as vantagens de maior biocompatibilidade, biodegradabilidade ajustável, resistência mecânica adequada e estrutura porosa. No entanto, devido à baixa resistência mecânica e à natureza frágil do hidrogéis, a viabilidade de aplicação de hidrogéis ainda é limitada. Assim, novos hidrogéis com e propriedades mais estáveis ainda são necessárias e continuam sendo uma importante direção para a pesquisa (CHAI; YANG; YU, 2017).

Figura 5: Representação da estrutura do hidrogel.

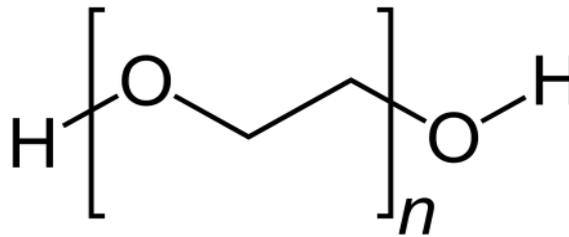


Fonte: (MELO et al., 2012).

4.3 Polietilenoglicol

O Polietilenoglicol (PEG) é um homopolímero sintético e linear que apresenta como fórmula molecular $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$, onde n é o número médio de grupos de óxido de etileno presentes na molécula, chamado grau de polimerização (CÔRTEZ et al., 2013).

Figura 6: Estrutura química do Polietilenoglicol (PEG).



Fonte: Adaptado de (THI et al., 2020).

Esse polímero pode ser encontrado em uma ampla faixa de pesos moleculares (200 a 10,000,000 g/mol). Os polietilenoglicóis com baixo peso molecular (200-700 g/mol) são líquidos não voláteis à temperatura ambiente, de (800-2000 g/mol) se apresentam no estado semi-sólido e acima de 3000 g/mol estão no estado sólido (KHANH, 2022).

Estes adjuvantes farmacêuticos são amplamente utilizados em formulações destinadas às vias parenteral, tópica, oral e retal, como plastificantes, co-solventes ou ainda na preparação de dispersões sólidas (ZANETTI; SOLDI; LEMOS-SENNA, 2002).

O PEG possui diversas propriedades que o tornam especialmente útil em várias configurações biológicas, químicas e farmacêuticas, como biocompatibilidade, o fato de ser não tóxico (quimicamente inerte), não imunogênico, solúvel em água, a proteínas e outras biomoléculas, como também altamente flexível, com a capacidade de bioconjugação sem impedimento estérico. Devido a essas propriedades, o PEG é amplamente utilizado no sistema de liberação controlada de fármacos (VENKATASUBBU et al., 2013).

Desta forma, o PEG é utilizado para a obtenção de hidrogéis, os quais são aplicados como matrizes para a liberação controlada de biomoléculas e como veículos de entrega de células para promover a regeneração de tecidos. A versatilidade química do PEG, juntamente com sua excelente biocompatibilidade, estimulou o desenvolvimento de numerosos sistemas de hidrogel projetados de forma inteligente para aplicações em medicina regenerativa (LIN.; ANSETH, 2009).

Segundo WEI et al. (2009), o PEG e o (PCL) poli(ácido láctico), são utilizados para a síntese do copolímero PCL-PEG, o qual é amplamente utilizado em sistemas de micro/nanopartículas ou hidrogéis, visto que são materiais biocompatíveis.

De acordo com AZEVEDO e colaboradores (2018), o PEG e o PMMA, podem ser utilizados para a síntese do copolímero PMMA-PEG, combinando características equivalentes aos seus polímeros de origem, como transparência e resistência, baixa toxicidade e fácil processamento, sendo um copolímero que apresentou potencial para ser utilizado em sistema de liberação controlada.

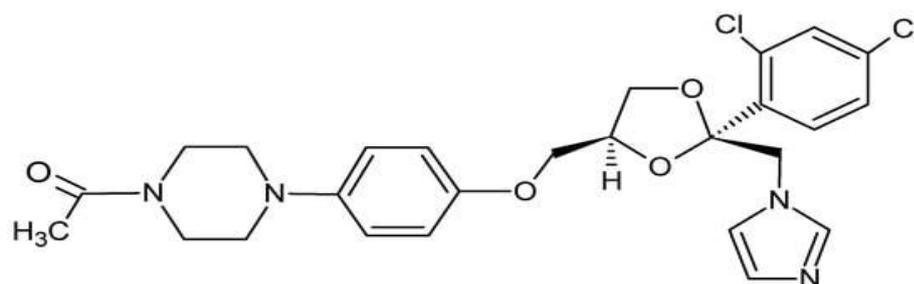
Neste trabalho, o PEG 4000 foi utilizado como polímero de partida, devido as suas propriedades que permitem sua utilização em sistemas de liberação controlada. Desta forma, o PEG 4000 e derivados foram estudados na liberação controlada do fármaco cetoconazol, com a finalidade de minimizar seus efeitos adversos.

4.4 Cetoconazol

O Cetoconazol (CET), quimicamente denominado *cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazolil-metil)1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina (Figura 7), é um antifúngico imidazólico. Apresenta fórmula molecular $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ e seu peso molecular é $531,44 \text{ g.mol}^{-1}$ (VENISHETTY et al., 2011).

CET tem uma natureza lipofílica que é considerada pelo seu valor $\log P$ de 3,1, praticamente insolúvel em água (0,05 mg/mL a 25 °C), e pertence a classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), pois possui alta permeabilidade e baixa solubilidade aquosa (DUDHIPALAA; AY; 2020).

Figura 7: Estrutura química do fármaco cetoconazol.



Fonte: (WINNICKA et al., 2012).

Tabela 2: Principais formulações farmacêuticas contendo cetoconazol comercializadas no Brasil.

Nome comercial	Forma farmacêutica	Laboratório
Candiderm [®]	creme	Aché
Candoral [®]	comprimidos	Aché
Cetoconazol [®]	comprimidos	Bergamo
Cetoconazol [®]	comprimidos, creme, xampu	Neo-Química
Cetonax [®]	comprimidos, creme, xampu	Janssen-Cilag
Cetonil [®]	comprimidos, creme, xampu	Stiefel
Cetozol [®]	comprimidos, creme, xampu	Cazi
Ketocon [®]	comprimidos	Cibran
Ketonan [®]	comprimidos, creme, xampu	Marjan
Miconan [®]	comprimidos, creme, xampu	Ativus
Nizoral [®]	comprimidos creme, xampu	Janssen-Cilag
Noriderm [®]	comprimidos, creme	EMS
Cetoconazol [®]	comprimidos	Davidson
Cetoconazol [®]	comprimidos	Ducto
Cetoconazol Bunker [®]	comprimidos creme xampu	Bunker
Cetozan [®]	comprimido creme xampu	Royton
Cetoconazol [®]	creme	Teuto Brasileiro
Cetoconazol	comprimidos	Teuto Brasileiro
Cetoconazol [®]	comprimidos, creme	Green Pharma
Cetoconazol [®]	comprimidos, creme, xampu	Honorterápica
Fungoral [®]	comprimidos, creme, xampu	Farmion
Cetoconazol [®]	comprimidos, xampu	Luper
Arcolan [®]	creme	Galderma

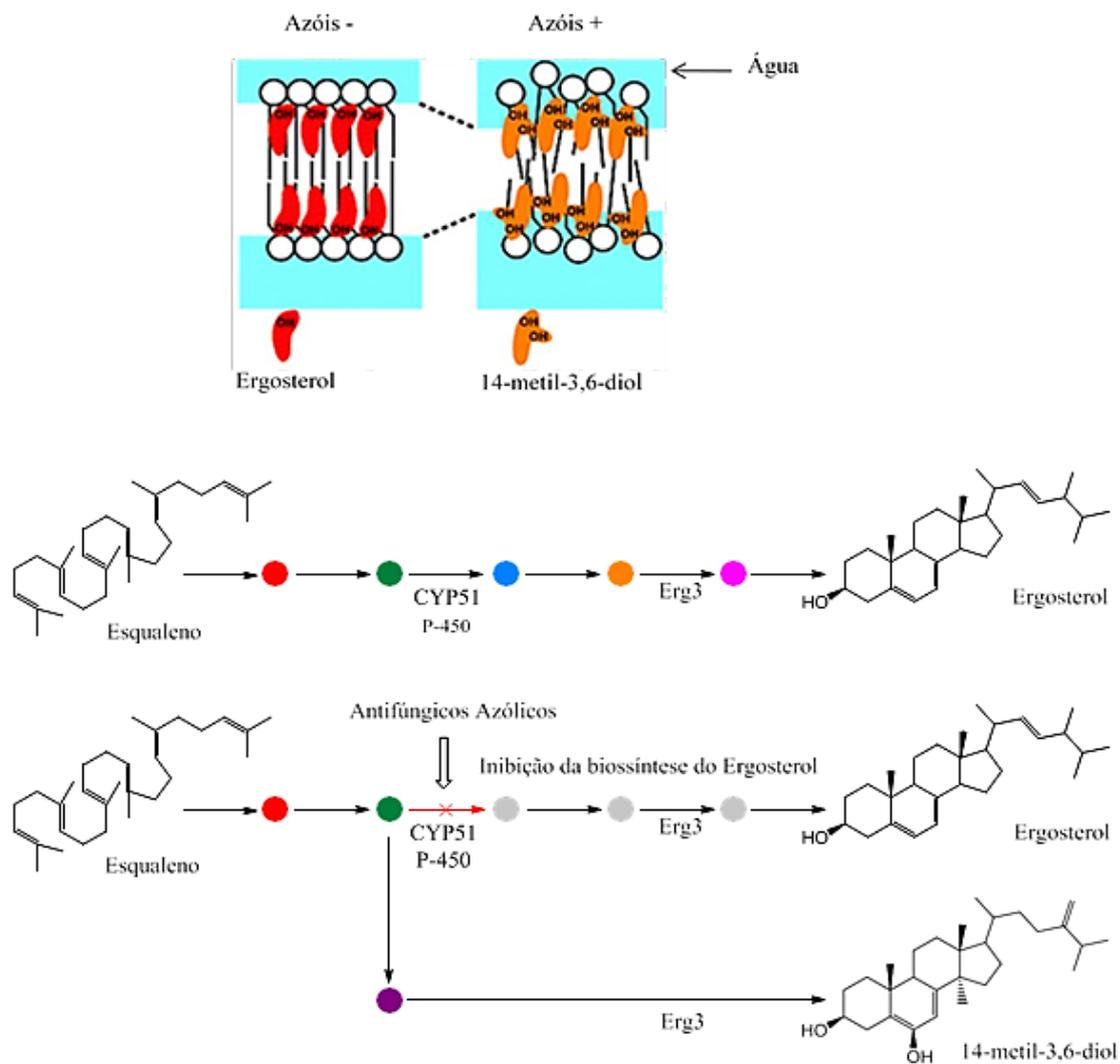
Fonte: (PERARO, 2001).

As associações com cetoconazol mais comercializadas no Brasil são: Candicort[®] (cetoconazol, betametasona) e Novacort[®] (cetoconazol, betametasona, sulfato de neomicina) ambas produzidas por Aché Laboratórios S/A e Cetocort[®](cetoconazol, betametasona) de Laboratório Teuto Brasileiro (PERARO, 2001).

4.4.1 Mecanismo de ação

O ergosterol é um lípido responsável pela fluidez e permeabilidade da membrana fúngica; sendo essencial para a viabilidade celular. Desta forma, o mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos baseia-se em inibir a enzima 14- α desmetilase do citocromo P450, que catalisa a conversão de lanosterol em ergosterol. Conseqüentemente, esses fármacos afetam a integridade das membranas fúngicas, alterando sua morfologia e inibindo o crescimento (SCORZONI et al., 2017).

Figura 8: Representação esquemática da alteração da composição e da organização da membrana celular e o mecanismo de ação dos azóis sobre a síntese do ergosterol.



Fonte: (SOUZA, 2018).

4.5.2 Atividade antifúngica

A entrada dos derivados imidazólicos na terapêutica (década de 70) representou um avanço no tratamento das micoses. Estes derivados imidazólicos foram os primeiros compostos a exercerem atividade contra o controle de leveduras; fungos que causam infecções em animais e humanos. A partir da introdução dos derivados imidazólicos na terapêutica, vários compostos foram desenvolvidos por diversos laboratórios, sendo utilizados no tratamento de micoses superficiais e sistêmicas (causadas por fungos invasivos), visto que possui atividade fungistática e fungicida (BASTOS, 2016).

A partir de 1981, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso do cetoconazol. O fármaco possui ação sistêmica e local, pode ser introduzido em diversas formulações (BASTOS, 2016).

As infecções causadas por fungos estão entre as causas mais comuns de doenças cutâneas. Dentre elas, podem se citar as malassezioses, que são as formas clínicas da infecção causada pela levedura do gênero *Malassezia*: foliculite e alguns autores correlacionam o fungo *Malassezia furfur* ao desenvolvimento da dermatite seborréica. Atualmente, o xampu de cetoconazol é uma forma de tratamento eficaz e amplamente utilizada para combater estas infecções (STAUB et al., 2007).

A pitiríase versicolor, também conhecida como tinea versicolor, é uma infecção fúngica superficial da pele que afeta principalmente o rosto, pescoço, braços e tronco, causada por espécies de *Malassezia sp.* Os medicamentos tópicos que são considerados a terapia de primeira linha para pitiríase versicolor incluem clotrimazol 1%, cetoconazol 2%, econazol, isoconazol, miconazol, ciclopirox olamina 1% e alilamina (terbinafina 1%) (VILAÇA et al., 2019).

A Candidíase é uma infecção fúngica, causada principalmente pela espécie *Candida albicans* (cerca de 85% dos casos), mas também pode ser causada pelas espécies *C. Glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. Parapsilopsis* (VASCONCELOS et al., 2016). Dados da literatura reportam que o cetoconazol é utilizado para o tratamento da candidíase vaginal (SAMARANAYAKE et al., 2009).

A histoplasmose é uma micose causada por fungo dimórfico, o *Histoplasma capsulatum*. O homem adquire a infecção através da inalação de conídeos presentes na natureza. A terapêutica da histoplasmose varia de acordo com a síndrome clínica e o estado imune do hospedeiro. O *H. capsulatum* é sensível a diversos antifúngicos, tais como anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol (FERREIRA; BORGES, 2009).

4.5.3 Efeitos adversos

Em 26 de julho de 2013, a Food and Drug Administration (FDA), órgão que faz o controle de medicamentos nos Estados Unidos, emitiu uma Comunicação de Segurança de Medicamentos limitando o uso de comprimidos orais de cetoconazol (CET). Até então, o CET era um tratamento sistêmico disponível para uma ampla gama de infecções fúngicas (GREENBLATT; GREENBLATT, 2014).

O aviso da FDA destacou, entre outros perigos, o risco de lesão hepática potencialmente associada ao CET. A declaração concluiu que comprimidos orais não deve ser um tratamento de primeira linha para qualquer infecção fúngica e deve ser usado somente quando terapias antifúngicas alternativas não estão disponíveis ou são toleradas. Desta forma, Itraconazol, fluconazol, voriconazol e terbinafina são alternativas disponíveis ao cetoconazol para terapia antifúngica oral (GREENBLATT, GREENBLATT, 2014).

Deste modo, o desenvolvimento de novas formulações de sistemas de liberação controlada são estratégias para minimizar os efeitos adversos do CET, além de aumentar a atividade terapêutica do fármaco (AHMED et al., 2021).

Em contrapartida, formulações tópicas contendo cetoconazol apresentam baixa toxicidade sistêmica, possuindo ação estritamente local, uma vez que o fármaco praticamente não é absorvido através da pele e mucosa. Contudo, esse tipo de formulação é utilizado para o tratamento de infecções cutâneas, apresentando um amplo espectro de ação, sendo uma alternativa eficaz (DUQUE et al., 2013).

5. METODOLOGIA

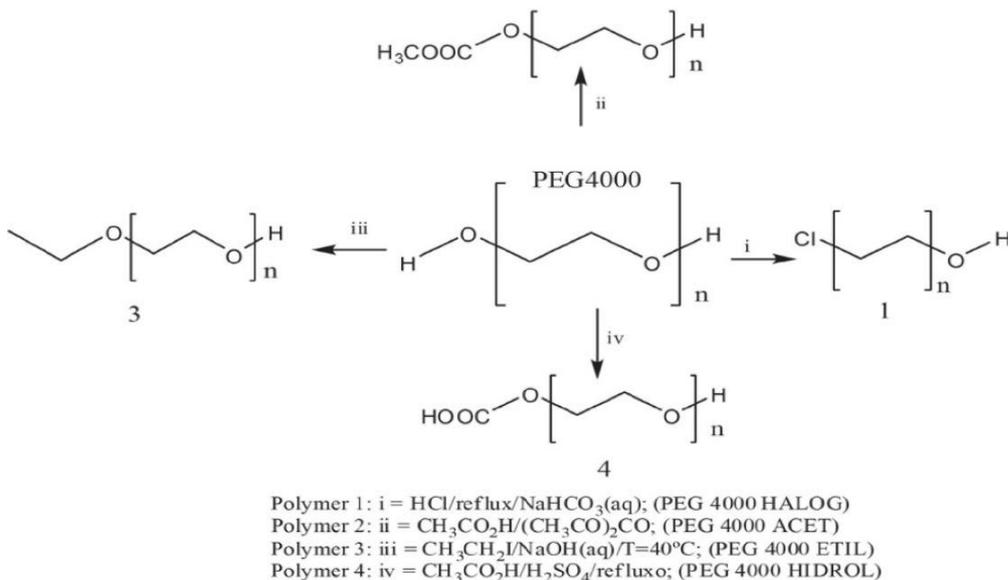
5.1 Materiais utilizados

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, ácido acético, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, iodeto de etila, cloreto de sódio, sulfato de magnésio anidro, clorofórmio, diclorometano, metacrilato de metila, polietilenoglicol 4000, cetoconazol (fármaco).

5.2 Síntese dos derivados de PEG 4000

Reação geral:

Figura 9: Síntese dos derivados de PEG 4000.



Fonte: (NASCIMENTO et al. 2020).

5.2.1 Reação de acetilação (PEG 4000 ACET)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,00g do PEG 4000 e foi solubilizado em 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 polímero.

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 mL de água gelada. O polímero modificado solidificou e foi separado por filtração simples. A fase orgânica foi recolhida e após a evaporação do solvente, obteve-se 1,00 g de um sólido seco em forma de filme (NASCIMENTO et al. 2020).

5.2.3 Reação de alquilação (PEG 4000 ETI)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,00 g do polímero, o qual foi adicionado em 10,00mL de diclorometano. Em seguida, foi foram adicionados 10 mL de hidróxido de sódio a 10%. A mistura reacional foi aquecida em banho de óleo com agitação magnética por 45 minutos. Foram adicionados 2,40mL de iodeto de etila e a mistura reacional foi mantida sob refluxo a uma temperatura de 40°C por 4 horas. Ao final da reação a mistura foi transferida para um funil de separação e foram adicionados 10,00 mL de água, 20,00mL de diclorometano e 10,00 mL de NaCl saturado para a separação de fases. A fase orgânica foi recolhida, seca com MgSO₄ anidro e filtrada. Após completa evaporação do solvente em estufa a 40°C, obteve-se 0,50 g de um sólido seco em forma de filme (NASCIMENTO et al. 2020).

5.2.4 Reação de halogenação (PEG 4000 HAL)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,00g do polímero e solubilizado em 10mL de diclorometano. Foram adicionados 0,50mL de ácido clorídrico à mistura. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 40 min. 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 foram adicionados 5,00mL de bicarbonato de sódio 5%. A fase orgânica foi recolhida e após a evaporação do solvente em estufa a 40°C, obteve-se 0,87 g de um sólido seco em forma de filme (NASCIMENTO et al. 2020).

5.2.5 Reação de esterificação seguida de hidrólise (PEG 4000 HIDROL)

Em um balão de fundo redondo 2,00g do polímero foram solubilizados em 10,00mL de diclorometano. Em um béquer foi preparada uma mistura com 0,10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 7,00 mL de ácido acético. Essa mistura foi adicionada ao balão contendo o polímero solubilizado 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 seca com MgSO₄ anidro. A fase orgânica foi filtrada e após completa evaporação do solvente em estufa a 40 °C, obteve-se 1,50 g de um sólido seco em forma de filme (NASCIMENTO et al. 2020).

5.3 Teste de Solubilidade

Foi testada a solubilidade do fármaco e de todos os polímeros em água e em solventes orgânicos polares e apolares como: diclorometano, metanol, dimetilsulfóxido e acetona (AZEVEDO, 2019).

5.4 Incorporação do cetoconazol aos polímeros modificados

Para o processo de incorporação, esquematizado na Figura 2, foram preparadas duas fases: aquosa e orgânica (NASCIMENTO et al. 2020).

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 (NASCIMENTO et al. 2020).

Fase orgânica: em outra chapa aquecedora, colocou-se aproximadamente 6,00mL de diclorometano em um béquer de 25,00mL. Quando o solvente alcançou a temperatura de aproximadamente 30°C, foram adicionados 0,3 gramas do polímero e 0,10 gramas de cetoconazol. Esse sistema foi mantido sob agitação até completa dissolução (NASCIMENTO et al. 2020).

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 (NASCIMENTO et al. 2020).

O processo de incorporação do cetoconazol em cada polímero é semelhante, de forma que ocorre mudança apenas na fase orgânica, substituindo-se o polímero em que se deseja incorporar o fármaco (PEG 4000, PEG4000 HAL, PEG4000 ETI, PEG4000 HIDROL ou PEG4000 ACET), nas mesmas condições de reação e proporções dos reagentes e precursores. Assim, essa reação foi reproduzida cinco vezes, com os diferentes polímeros, resultando nos polímeros incorporados com cetoconazol: PEG 4000 INCORP; PEG 4000 ACET INCORP, PEG 4000 HAL INCORP, PEG 4000 ETI INCORP, PEG 4000 HIDROL INCORP. (NASCIMENTO et al. 2020).

5.5 Caracterizações

5.5.1 Microscopia de força atômica (MFA)

A caracterização por AFM foi realizada através do equipamento BrukerMultiMode 8 SPM, utilizando o modo de imagem Peak Force Quantitative NanoMechanical®. Cantilevers (Bruker), com constantes de mola de 0,4 - 0,8 N m⁻¹ e um raio de curvatura da ponta ~ 10 nm, foram usados ao longo do estudo. Todas as imagens AFM foram processadas (nivelamento, perfil e renderização 3D) usando o software Gwyddion (NECAS; KLAPETEK, 2012).

5.5.2 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

As análises MEV foram realizadas em um equipamento JEOL, JSM6510, e a preparação da amostra foi feita em um evaporador Quorum (NASCIMENTO et al. 2020).

5.5.3 Determinação do Potencial Zeta

O Potencial Zeta das partículas das amostras de PEG 4000 e derivados sem incorporação e incorporados com o fármaco foi determinado por medidas de mobilidade eletroforética usando Zetasizer (Malvern, modelo Zetasizer série Nano, Nano ZS). As amostras foram diluídas em água ultrapura e inseridas em uma célula capilar. As medições foram realizadas em triplicata para dez amostras diferentes e os resultados foram expressos em milivolts (mV) (SOUZA et al., 2021).

5.6 Análise Estatística

Os resultados foram reportados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguido pela comparação com o teste de Bonferroni através do software Graphpad Prisma 5.01 (RADUSHEV, 2007). O nível de significância foi $p < 0,05$.

5.7 Solução tampão

Para a metodologia de liberação foram utilizadas duas soluções tampão de pH 7,3, para mimetizar o pH sanguíneo (AZEVEDO, 2019).

5.7.1 Solução 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 (AZEVEDO, 2019).

5.8 Curva Padrão

A curva padrão foi realizada com o preparo de soluções contendo o fármaco cetoconazol e a solução tampão de pH 7,3 em concentrações crescentes (10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$) em balões volumétricos de 10mL. Adaptado de (AZEVEDO, 2019). Cada solução foi analisada no espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 225 nm, de acordo com o preconizado (BRASIL, 2019).

5.9 Liberação controlada

Para a liberação controlada foram feitas leituras de absorbâncias no espectrofotômetro de UV e o comprimento de onda utilizado foi 225nm, de acordo com o preconizado (BRASIL, 2019). As soluções de liberação foram preparadas em balões de 10mL com concentrações crescentes. 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 6 horas, sendo que nas primeiras 4 horas foram lidas alíquotas a cada 30 minutos e posteriormente a cada 1 hora. Dessa forma, as soluções de cada polímero foram preparadas separadamente com a solução tampão de pH 7,3, gerando assim 10 soluções de liberação. Adaptado de (AZEVEDO, 2019).

5.10 Ensaio de Viabilidade Celular

Macrófagos RAW 264.7, cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma®), foram distribuídos em placa de microtitulação de 96 poços utilizando densidade de 5×10^5 células/poço e após, foram incubados a 37°C com 5% de CO_2 por 24 h. As células foram tratadas com as amostras dissolvidas em RPMI 2% dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações variando de 1000,00 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$. A viabilidade celular foi avaliada usando o método de redução de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). O meio foi removido e os poços lavados com

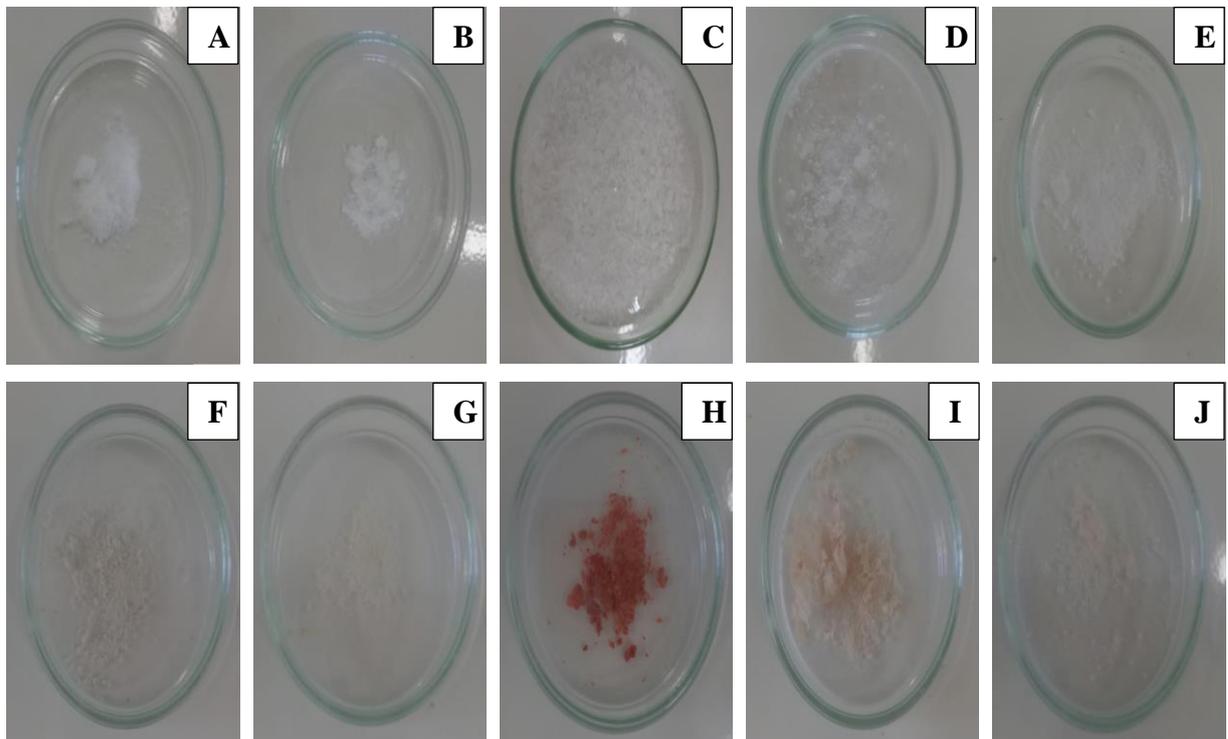
RPMI. Em seguida, 100 μ L de RPMI sem vermelho de fenol contendo 10% de soro fetal bovino e 50 μ L de MTT 2 mg/mL filtrado foram adicionados aos poços. As placas foram cobertas e incubadas durante 4 horas. Após esse tempo, a reação foi interrompida com 100 μ L de DMSO e a absorbância das amostras foi lida em um leitor de microplacas (570 nm). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada usando o software GraphPad Prism 8.0.1.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Sínteses dos polímeros

De acordo com a figura 10, os polímeros modificados sem incorporação apresentam o aspecto físico de partículas sólidas e de cor branca. Já os polímeros incorporados com cetoconazol apresentaram aspecto de filme. Esses resultados são um indicativo de que ocorreu o processo de incorporação do fármaco nas matrizes poliméricas.

Figura 10: Aspecto físico dos polímeros. PEG 4000 (A), PEG 4000 ACET (B), PEG 4000 HIDROL (C), PEG 4000 ETI (D), PEG 4000 HAL (E); PEG 4000 INCORP (F), PEG 4000 ACET INCORP (G), PEG 4000 HIDROL INCORP (H), PEG 4000 ETI INCORP (I), PEG 4000 HAL INCORP (J).



6.2 Teste de solubilidade

Através da realização dos testes de solubilidade verificou-se que todos os polímeros, PEG 4000 e derivados e o cetoconazol tiveram melhor solubilidade no solvente diclorometano. Contudo, este foi o solvente de escolha, uma vez que é necessário que todos os componentes para a incorporação sejam solúveis no mesmo solvente facilitando a incorporação.

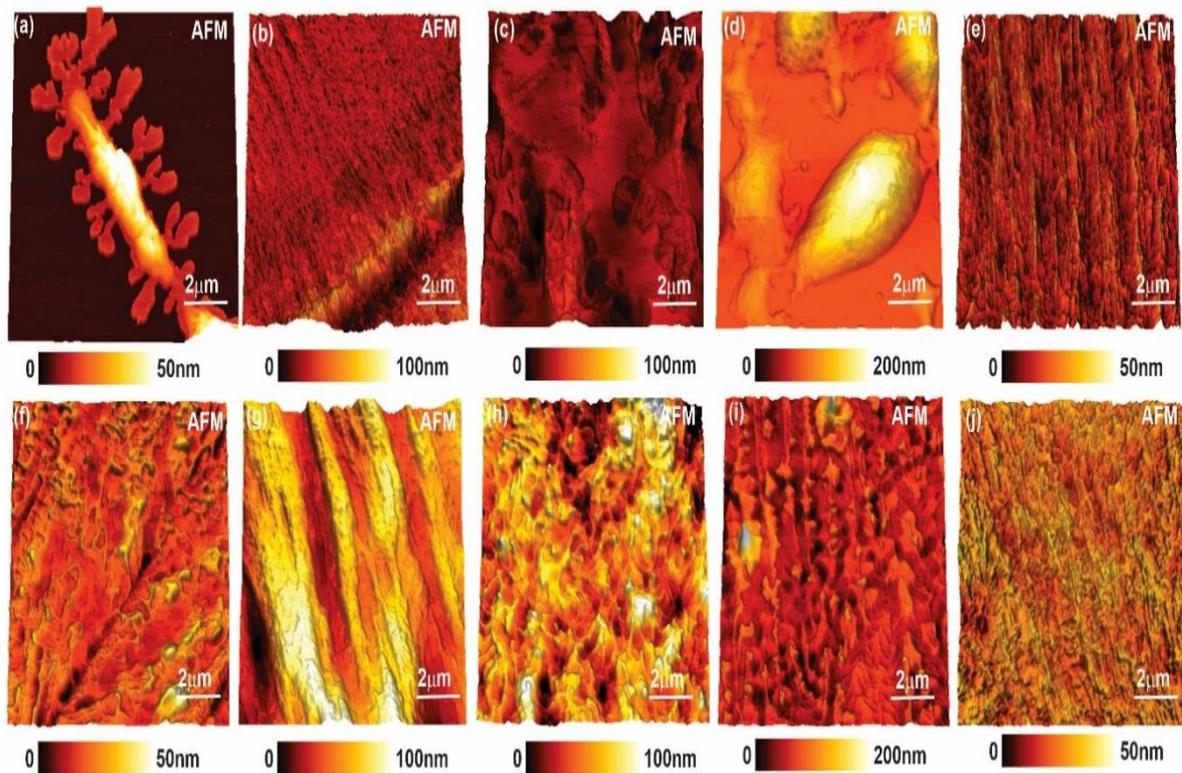
6.3 Caracterizações

6.3.1 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Através da técnica de Microscopia de Força Atômica é possível determinar a morfologia da superfície, como parâmetros de rugosidade, parâmetros de amplitude ou altura, parâmetros funcionais ou estatísticos e a topografia de uma determinada amostra (CHOUHAN; BAJPAI; BHATT, 2019).

De acordo com a figura 11 é possível observar mudanças consideráveis na organização do filme polimérico, após o processo de incorporação do fármaco.

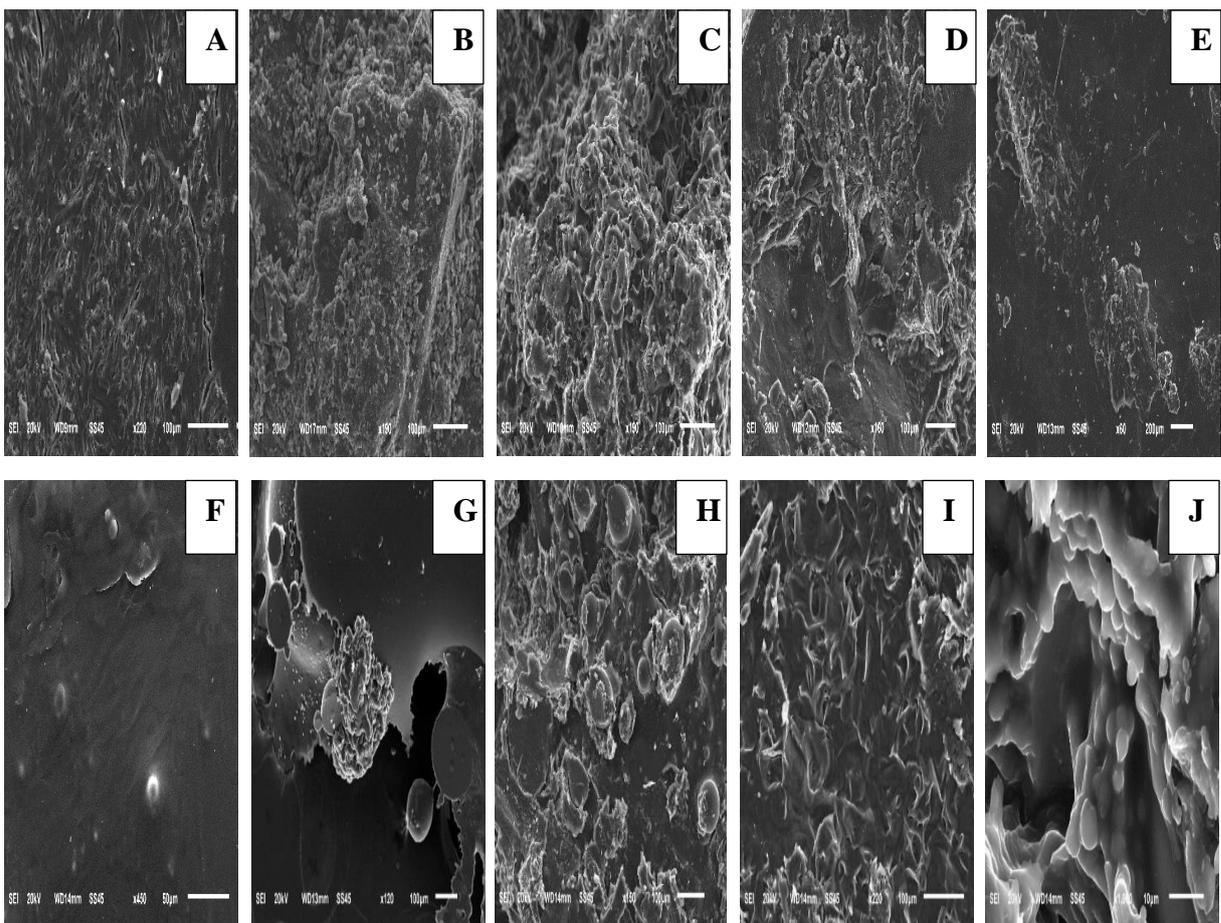
Figura 11: Microscopia de força atômica dos polímeros. PEG 4000 (a), PEG 4000 ACET (b), PEG 4000 HIDROL (c), PEG 4000 ETI (d), PEG 4000 HAL (e), PEG 4000 INCORP (f), PEG 4000 ACET INCORP (g), PEG 4000 HIDROL INCORP (h), PEG 4000 ETI INCORP (i), PEG 4000 HAL INCORP (j).



6.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

De acordo com as fotomicrografias (Figura 12), observa-se que após o processo de incorporação ocorreu a formação de microsferas, as quais são sistemas que irão carrear o fármaco. Desta forma, é possível visualizar que em todos os polímeros incorporados com cetoconazol tiveram formações de microsferas, com destaque para o PEG 4000 HIDROL INCORP (J) e PEG 4000 ETI INCORP (H) que aparentemente apresentaram maior quantidade de microsferas. Aparentemente, nota-se que PEG 4000 HAL INCORP (I) não apresentou microsferas de forma representativa, mas o fármaco exerceu influência nessa matriz polimérica.

Figura 12: Fotomicrografias dos polímeros. PEG 4000 (A), PEG 4000 ACET (B), PEG 4000 ETI (C), PEG 4000 HAL (D), PEG 4000 HIDROL (E), PEG 4000 INCORP (F), PEG 4000 ACET INCORP (G), PEG 4000 ETI INCORP (H), PEG 4000 HAL INCORP (I), PEG 4000 HIDROL INCORP (J).



6.3.3 Potencial Zeta

Tabela 3: Potencial Zeta do PEG 4000 e derivados e incorporados. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

Amostras	Potencial Zeta (mV)
PEG 4000	-15,0 \pm 2,9 ^{a-b}
PEG 4000 ACET	-11,5 \pm 0,2 ^{a-b}
PEG 4000 HIDROL	-6,9 \pm 5,5 ^a
PEG 4000 ETI	-19,9 \pm 3,2 ^b
PEG 4000 HALOG	-9,9 \pm 1,5 ^{a-b}
PEG 4000 INCORP	-14,0 \pm 0,7 ^{a-b}
PEG 4000 ACET INCORP	-16,2 \pm 2,4 ^{a-b}
PEG 4000 HIDROL INCORP	+10,8 \pm 9,0 ^c
PEG 4000 ETI INCORP	+4,6 \pm 1,3 ^c
PEG 4000 HALOG INCORP	-15,9 \pm 4,7 ^{a-b}

Diferentes letras minúsculas, representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados encontrados analisados em triplicata.

O Potencial Zeta é um indicador de carga superficial, que determina a estabilidade das partículas (VOGEL et al., 2017). De acordo com a literatura, um alto Potencial Zeta (negativo ou positivo) significa que as partículas tendem a se repelir. Considera-se que valores de Potencial Zeta entre -30 mV e 30 mV indicam instabilidade do sistema, e os demais valores sugerem um sistema estável (OLIVEIRA, 2014).

Em relação a tabela 2, nota-se que as amostras de PEG 4000 e derivados e incorporados apresentam valores menores que $|30|$ mV. Embora um valor maior que $|30|$ mV seja recomendado para formulações estáveis, a estabilização estérica fornecida pelos grupos de superfície volumosa do PEG seria suficiente para garantir a estabilidade (DIEHL, 2008). Além disso, as partículas poliméricas podem ser estabilizadas por estabilização eletrostática e / ou estérica usando surfactantes, como o poli (álcool vinílico) (ACEVEDO-FANI, 2015).

Em relação aos valores de potencial zeta do PEG 4000 HIDROL, PEG 4000 ETI quando comparados com os seus respectivos polímeros incorporados, nota-se que houve uma variação significativa do Potencial Zeta após a incorporação do fármaco, sendo estatisticamente diferentes.

Os valores de Potencial Zeta positivos para o PEG 4000 HIDROL INCORP e PEG 4000 ETI INCORP podem estar associados com a influência das cargas positivas do grupo imidazol presentes na estrutura química do fármaco (SIWACH; VERMA, 2021).

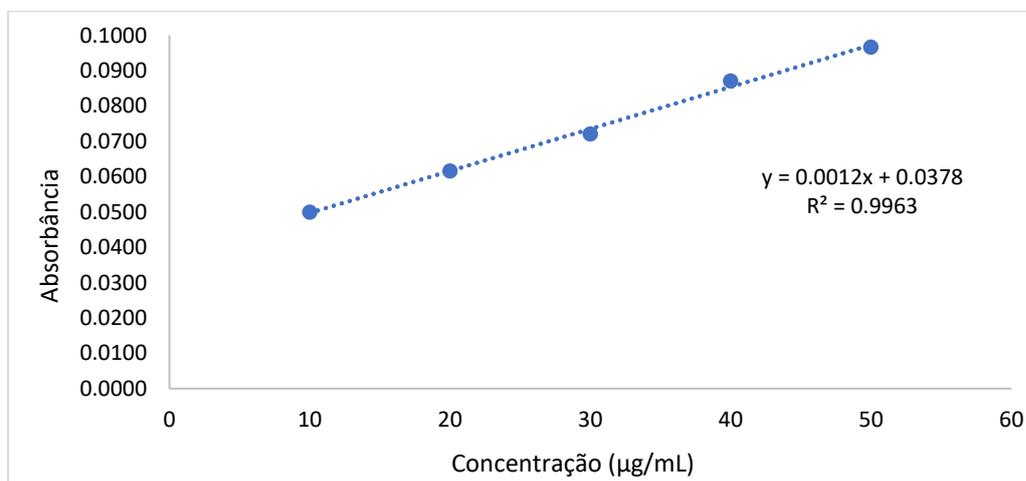
Os valores encontrados de Potencial Zeta para o PEG 4000, PEG 4000 ACET, PEG 4000 HAL, quando comparados com os seus respectivos polímeros incorporados, demonstram que mesmo com a incorporação do fármaco, o valor do Potencial Zeta não alterou de forma significativa. Os valores não são estatisticamente diferentes. Assim, o sistema manteve-se com o equilíbrio das cargas mesmo com a presença do ativo.

6.4 Curva padrão

A curva de calibração foi obtida empregando-se cetoconazol em solução tampão de pH 7,3 nas concentrações de 10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL, 40µg/mL e 50µg/mL. Obteve-se a equação da reta através de estudos de regressão linear, analisando-se as concentrações de cetoconazol e suas respectivas leituras.

Sendo assim, é possível visualizar graficamente na figura, a curva padrão do cetoconazol. A equação da reta apresentou-se como: $y = 0,0012x + 0,0378$, onde x é a concentração em µg /mL e y a absorbância do espectro. Ademais, nota-se uma tendência linear, confirmada pelo valor de R^2 próximo de 1 (KUMARI; YADAV, 2018).

Figura 13: Curva padrão do fármaco cetoconazol.



6.5 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

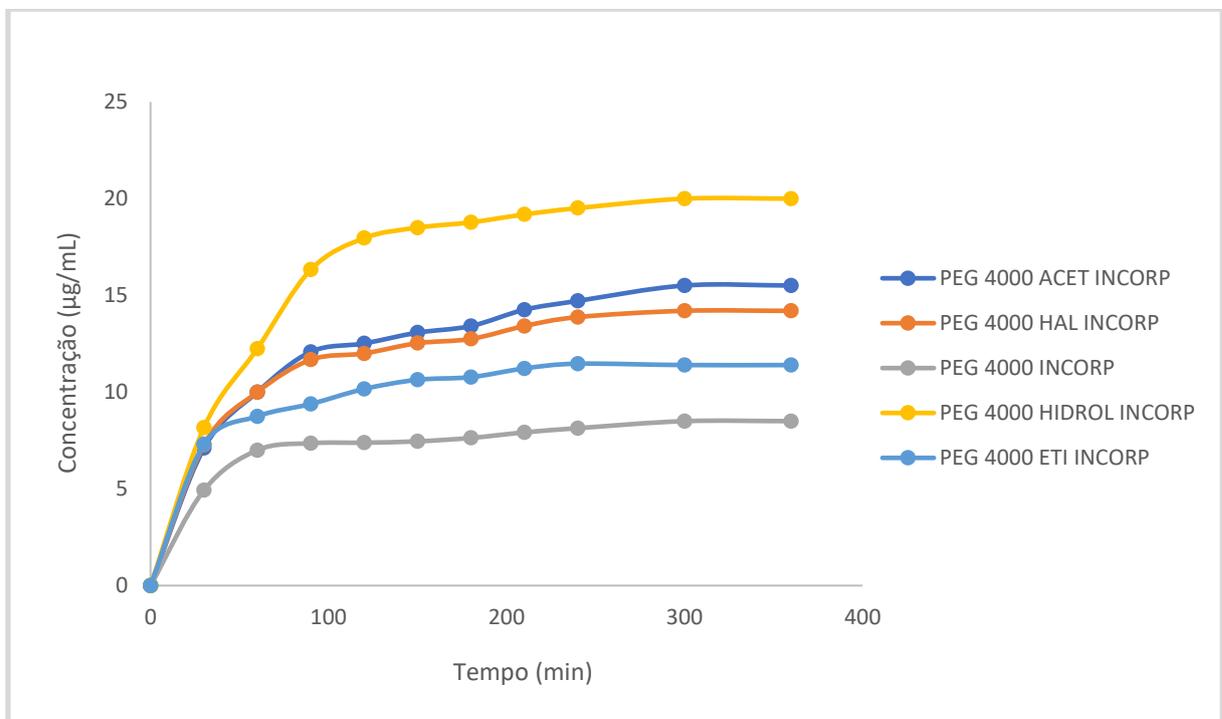
Aa- absorbância da amostra,

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

A_p – absorbância do padrão

C_p – concentração do padrão

Figura 14: Gráfico de liberação controlada dos polímeros incorporados em pH 7,3.



A partir das curvas de liberação obtidas no comprimento de onda de 225nm é possível avaliar o comportamento de cada polímero modificado. De acordo com a literatura, os sistemas

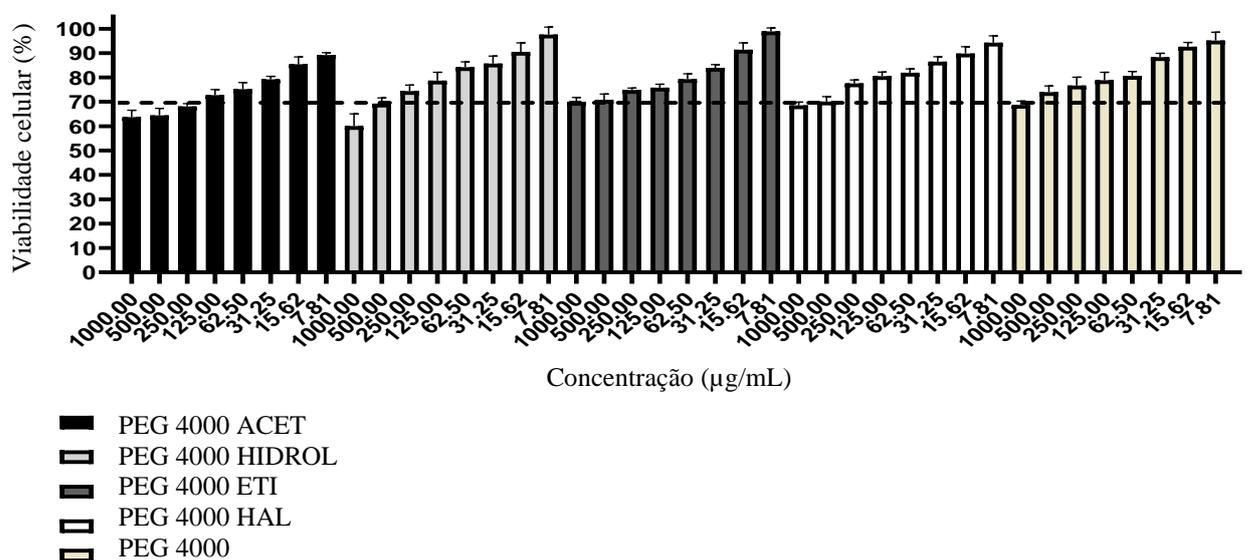
de liberação controlada são caracterizados pela liberação bimodal ou sigmoideal, no qual consiste em duas fases distintas. A primeira é caracterizada pela liberação acelerada, a fim de que haja nas primeiras horas um “up grade” na liberação, fenômeno este que ocorre para que o fármaco possa chegar até a faixa de concentração terapêutica. A segunda fase consiste em uma liberação lenta, para a manutenção do fármaco na janela terapêutica (ALVES, 2011).

Desta forma, todos os polímeros incorporados utilizados na liberação controlada em pH 7,3 representados na figura 16, apresentaram perfil de liberação contínuo, de acordo com o resultado preconizado.

6.6 Ensaio de viabilidade celular

Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade foram comparados com a norma ISO2009 - 10993-5, que estabelece que uma substância é considerada citotóxica quando a viabilidade celular é inferior a 70% (ISO, 2009). Portanto, o ensaio MTT forneceu os dados relacionados aos polímeros conforme Figura. Com base nos resultados obtidos (Figura 15), observou-se que os polímeros são atóxicos para células em estudo nas concentrações abaixo de 250,00 µg/mL, com exceção do PEG 4000 ACET (não-tóxico em concentrações abaixo de 125,00 µg/mL), pois nestes casos, a viabilidade celular foi superior a 70%, portanto, considerada de baixa toxicidade.

Figura 15: Gráfico de viabilidade celular dos polímeros.

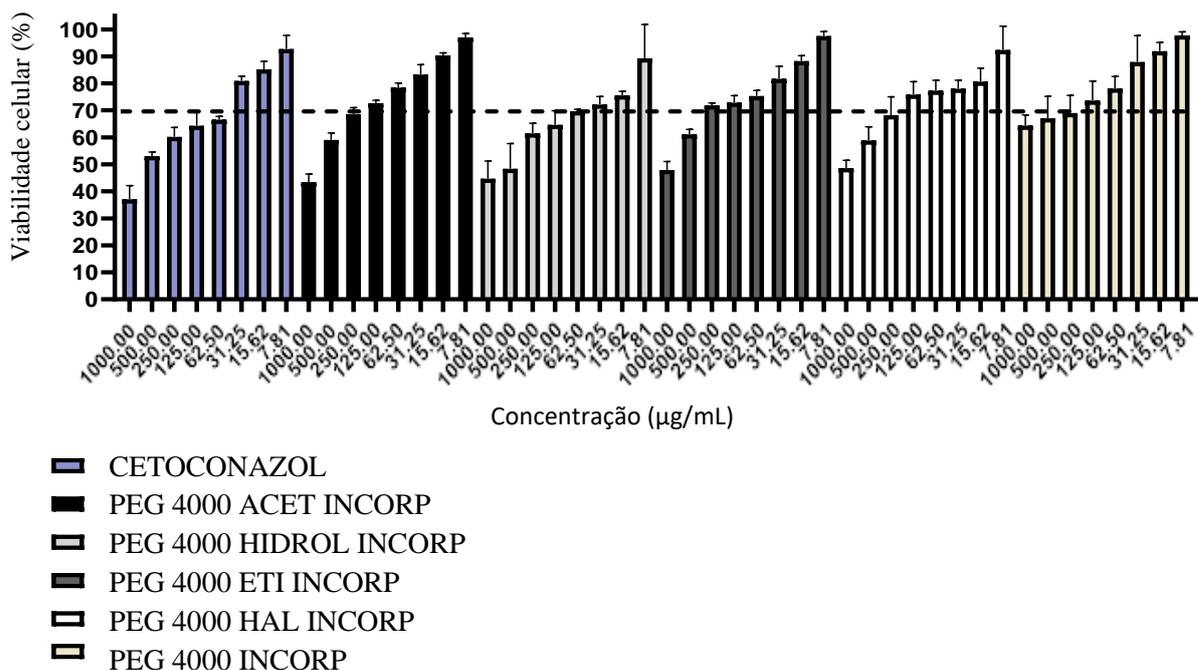


A citotoxicidade do cetoconazol puro foi determinada para comparar com a do cetoconazol incorporado nos outros polímeros (Figura 16). Observa-se que o cetoconazol puro foi citotóxico para as células na maioria das concentrações testadas, sendo atóxico apenas em concentrações abaixo de 31,25 $\mu\text{g/mL}$.

Os perfis de citotoxicidade do cetoconazol incorporado aos derivados do PEG 4000 variam de acordo com o tipo de polímero utilizado para realizar a incorporação. Aparentemente, o cetoconazol incorporado ao PEG 4000 HIDROL apresentou perfil semelhante ao do cetoconazol puro (não citotóxico em concentrações inferiores a 31,25 $\mu\text{g/mL}$), sugerindo que este material não foi capaz de reduzir a toxicidade do fármaco.

A citotoxicidade do cetoconazol incorporado ao PEG 4000 ACET e PEG 4000 HAL apresentou melhora considerável, uma vez que a viabilidade celular foi superior a 70% em concentrações abaixo de 125,00 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a maior redução na citotoxicidade do fármaco foi observada quando o cetoconazol foi incorporado ao PEG 4000 ETI, uma vez que o percentual de viabilidade celular foi superior a 70% em concentrações abaixo de 250,00 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo que esta seria a matriz polimérica mais eficaz indicada para reduzir a toxicidade inerente do fármaco.

Figura 16: Gráfico de viabilidade celular dos polímeros incorporados.



7. CONCLUSÃO

- As reações de modificações realizadas na cadeia do polímero PEG 4000 exercem influência na força de interação entre fármaco-polímero.
- A incorporação do fármaco cetoconazol nas matrizes poliméricas foi efetiva devido a formação de microesferas.
- O Potencial Zeta das amostras de PEG 4000 e derivados e incorporados apresentaram valores menores que $| 30 |$ mV indicando que esses polímeros apresentaram baixa carga eletrostática.
- As matrizes poliméricas de PEG 4000 e derivados e incorporados não foram tóxicas para as células sugerindo que podem ser usadas em organismo vivo.
- As matrizes poliméricas de PEG 4000 e derivados apresentam potencial para a liberação controlada do fármaco cetoconazol.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-FANI, A. et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, v.47, p.168-177, 2015.

ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, v.26, n.19, p.1-45, 2021.

AHMED, T. A. et al. Study the Antifungal and Ocular Permeation of Ketoconazole from Ophthalmic Formulations Containing Trans-Ethosomes Nanoparticles. *Pharmaceutics*, v.13, n.2, p.1-24, 2021.

ALVES, T. V. G. Obtenção e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida-co-metilcelulose como sistemas carreadores de cloridrato de propranolol. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2011.

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.

AZEVEDO, M. L. S. Estudo inédito de liberação controlada e citotoxicidade do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e derivados incorporados com o fármaco benznidazol 2019. 59 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

BASTOS, J. S. Desenvolvimento de sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio e cetoconazol. 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2016.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 6.ed. Volume 2. 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.

CHAI, Q. YANG, J., YU, X. *Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them*. *Gels*, v.3, n.1, p.1-15, 2017.

CHOUHAN, S.; BAJPAI, A. K.; BHATT, R. Analysis of topographical parameters and interfacial interaction of zinc oxide reinforced poly (vinyl alcohol-g-acrylonitrile) nanocomposite film surfaces using atomic force microscopy. *Nano-Structures & Nano-Objects*, v.18, n. 100308, 2019.

CÔRTEZ, M.A. et al. Imunomodulação de fagócitos do sangue humano pelo extrato de *Strychnos Pseudoquina* ST. HILL adsorvido em microesferas de Polietilenoglicol. *Polímeros*, v.23, n.3, p.402-409, 2013.

DIEHL, B. In *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*; Holzgrabe, U.; Wawer, I.; Diehl, B., eds.; Elsevier Science: Poland, 2008, ch. 2.

DUDHIPALAA, N.; AY, A. A. Amelioration of ketoconazole in lipid nanoparticles for enhanced antifungal activity and bioavailability through oral administration for management of fungal infections. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.232, p.1-11, 2020.

DUQUE, M.D. et al. Avaliação das propriedades físico-químicas de preparações farmacêuticas contendo cetoconazol para uso tópico. *HU Revista*, v. 39, n. 3 e 4, p.45-49, 2013.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.2, p.192-198, 2009.

FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, v.214, p.1–38, 2005.

GREENBLATT, H. K.; GREENBLATT, D. J. Liver injury associated with ketoconazole: Review of the published evidence. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v.54, n.12, p.1321–1329, 2014.

GUPTA, A. K.; LYONS, D. C.A. The Rise and Fall of Oral Ketoconazole. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v.19; n.4, p. 352-7, 2015.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, v.49, n.8, p.1993-2007, 2008.

HUYNHA, C. T.; LEE, D. S. Controlled Release. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, p.1-12, 2014.

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).

KHANH, H. P. L. et al. Comparative Investigation of Cellular Effects of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives. *Polymers*, v.14, n.2, p.1-15, 2022.

KUMARI, K.; YADAV, S. Linear regression analysis study. *Journal of the Practice of Cardiovascular Sciences*, p.33-36, 2018.

KUSHAL, M. Oral Controlled Release Drug Delivery System: An Overview. *International Research Journal of Pharmacy*, v.4, n.3, p.70-76, 2013.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, v. 125, p.75-84, 2015.

LEE, K. Y.; YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science*, v.32, n.7, p.669-697, 2007.

LIN, C.C.; ANSETH, K. S. PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. *Pharmaceutical Research*, v.26, n.3, p.631-643, 2009.

LIU, L. et al. Particle-size Measurements in a Micro-channel with Image Dynamic Light Scattering Method. *Procedia Engineering*, v. 102, p. 904–910, 2015.

LYRA, M.A.M. et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.26, n.5, p. 784-793, 2007.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*, v.10, suppl. 1, p.1–10, 2004.

MATOS, B. N. et al. Preparações farmacêuticas e cosméticas com uso de nanotecnologia. *Brasília Médica*, v.52 n.1, p.8-20, 2015.

MELO, C. S. et al. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.33, n.4, p. 469-477, 2012.

MENDES, J. B. E. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

MOURA, M. R; RUBIRA A. F.; MUNIZ, E. C. Hidrogéis semi-IPN baseados em rede de alginato-Ca²⁺ com PNIPAAm entrelaçado: propriedades hidrofílicas, morfológicas e mecânicas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 18, n. 2, p. 132-137, 2008.

NASCIMENTO, L. G. et al. Novel PEG 4000 derivatives and its use in controlled release of drug indomethacin. *Química Nova*, v. 43, n. 6, p. 685-691, 2020.

NECAS, D.; KLAPETEK, P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Central European Journal of Physics*, v.10, p.181–188, 2012.

OLIVEIRA, R. D. DE. Preparação, caracterização e aplicação de filmes lbi com nanopartículas de prata estabilizadas em amido. 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

PEIXOTO, A. C. B. Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

PERARO, A. C. Estabilidade física e metodologia analítica para formulações farmacêuticas contendo cetoconazol. 2001. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PFISTER, D.; MORBIDELLI, M. Process for protein PEGylation. *Journal of Controlled Release*, v. 180, p. 134-149, 2014.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.5, n.4, p.447-451, 2001.

RADUSHEV, D.; Prism 5 for Windows, version 5.01; GraphPad Software, United States, 2007.

SAMARANAYAKE, L. P .et al. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology* 2000, v.49, p.39-59, 2009.

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.

SCORZONI, L.et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology*, v.8, p.1-23, 2017.

SEVERINO P. et al. Polímeros Sintéticos Biodegradáveis: Matérias-primas e Métodos de Produção de Micropartículas para uso em Drug Delivery e Liberação Controlada. *Polímeros*, v.21, n.4, p. 286-292, 2011.

SINGH, A. P. et al. Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 4, n. 33, p.1-21, 2019.

SIWACH A.; VERMA, P. K. Synthesis and therapeutic potential of imidazole containing compounds. *BMC Chemistry*, v.15, n.12, p.1-69, 2021.

SOUSA, L. R. et al. Trypanocidal Activity and Increased Solubility of Benznidazole Incorporated in PEG 4000 and Its Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.32, n.6, p.1162-1172, 2021.

SOUZA, Z.A. Síntese e avaliação da atividade anti-trypanosoma cruzi e antifúngica de novos derivados triazólicos. 2018. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

STAUB, I. et al. Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.2, p.301-307, 2007.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, v.7, n. 2, p.12-20, 2006.

SUNG, Y. K.; KIM, S. W. Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*, v. 24, n.12, p.1-12, 2020.

THI, T. T. H. et al. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers*, v.12, n.2, p.1-21, 2020.

VASCONCELOS, C. N. E. et al. Estudo comparativo entre terapia oral e local no tratamento de corrimentos vaginais: candidíase, tricomoníase e vaginose bacteriana. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v.15, n.1, p. 123-128, 2016.

VENISHETTY, V. K. et al. Application of Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Docetaxel and Ketoconazole in Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Chromatographic Science*, v. 49, n.2, p.136-141, 2011.

VENKATASUBBU, G. D. et al. Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Powder Technology*, v.235, p. 437-442, 2013.

VILAÇA, D. H. V. et al. Tratamento farmacológico da pitíriase versicolor: uma revisão integrativa. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 2, n. 3, p. 2107-2116, 2019.

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

VOGEL, R. et al. Resolution Single Particle Zeta Potential Characterisation of Biological Nanoparticles using Tunable Resistive Pulse Sensing. *Scientific Reports*, v.7, n.17479, p.1-13, 2017.

WEI, X. et al. Biodegradable poly(-caprolactone)–poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v.381, n.1, p.1–18, 2009.

WINNICKA, K. et al. Hydrogel of Ketoconazole and PAMAM Dendrimers: Formulation and Antifungal Activity. *Molecules*, v.17, n.4, p. 4612-4624, 2012.

ZANETTI, B. G.; 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 Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 229-236, 2002.