



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ALAINÉ MARIA DOS SANTOS SILVA**

**NANOPARTÍCULAS CATIÔNICAS OBTIDAS POR**  
**EMULSIFICAÇÃO COM EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE PARA**  
**LIBERAÇÃO MODIFICADA DE BENZNIDAZOL**

**NATAL-RN**

**2015**

**ALAINE MARIA DOS SANTOS SILVA**

**NANOPARTÍCULAS CATIÔNICAS OBTIDAS POR EMULSIFICAÇÃO  
COM EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE PARA LIBERAÇÃO  
MODIFICADA DE BENZNIDAZOL**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande  
do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de  
mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior**

**NATAL-RN**

**2015**

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

Silva, Alaine Maria dos Santos.

Nanopartículas catiônicas obtidas por emulsificação com evaporação de solvente para liberação modificada de benznidazol / Alaine Maria dos Santos Silva. – Natal, 2015.

71f.: il.

Orientador: Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Tecnologia farmacêutica - Nanopartículas - Dissertação. 2. Benznidazol - Dissertação. 3. Emulsificação - Evaporação do solvente - Dissertação. I. Silva Júnior, Arnóbio Antônio da. II.

Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 615.014(043.3)


**ALAINE MARIA DOS SANTOS SILVA**

**NANOPARTÍCULAS CATIÔNICAS OBTIDAS POR EMULSIFICAÇÃO  
COM EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE PARA LIBERAÇÃO  
MODIFICADA DE BENZNIDAZOL**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior  
Presidente – UFRN

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Franceline Reynaud  
Examinador Externo – UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Luiza Porpino Fernandes Caroni  
Examinador Interno – UFRN

Natal, 02 de julho de 2015

**NATAL-RN**

**2015**

“Todo mundo é um cientista maluco e a vida é o Laboratório. A gente está sempre experimentando, tentando achar um jeito de viver, de resolver os problemas...”

*David Cronenberg*

Dedico esse trabalho a Deus e aos meus pais, Maria de Fátima e Arlindo Guedes, alicerces em  
minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que se mostrou criador e foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Ao meu pai Arlindo, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível.

À minha mãe Fátima, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me ama, apoia e acredita na minha capacidade. Meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo e, sem dúvidas, foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho.

Ao meu irmão Arlendell e à minha prima-irmã Maria Clara. Tenho a certeza de que ser irmão está além da convivência mútua, e sim estarmos unidos pelos eternos laços de amor.

Ao meu tio Antônio e à minha tia Trindade, por estar sempre torcendo e rezando para que meus objetivos fossem alcançados.

Ao meu avô José Mariano (*in memoriam*) e ao meu tio Irani da Silva (*in memoriam*), por serem pessoas que sonhavam em ver essa minha conquista e que mostraram muitas vezes que um gesto marca mais que muitas palavras. Corações bondosos que dedicaram suas vidas à família.

Ao meu namorado Petrócio, pessoa com quem partilhei grande parte desse meu trajeto. Com você me senti mais viva de verdade. Obrigada pelo carinho, amor, paciência e por sua capacidade de me trazer paz e alegria em meio a grandes turbulências.

Ao professor Dr. Arnóbio Antônio por sua dedicação, paciência e confiança ao longo das supervisões até a concretização desse trabalho. Uma pessoa a qual já admirava antes mesmo de conhecer ao passear pela plataforma lattes e hoje estou aqui prazerosamente como sua orientanda. Quando “crescer” quero ter ao menos metade do seu conhecimento científico. Obrigada por tudo!

À Lília Basílio por dedicação, incentivo e paciência diante desse trabalho. Levarei sempre comigo cada conhecimento científico e conselho que você me passou. Sem você muitas coisas não teriam fluído. Realmente uma amiga que levarei para o resto da vida.

A minhas amigas-irmãs, Monique e Cida, pela amizade, confiança e apoio em todos os momentos da minha vida. Cada batalha que vencemos individualmente sempre comemoramos como uma vitória coletiva. Vocês são bênçãos de Deus em vida.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, dos quais cito de forma especial: Manoela, Allanny, Izadora, Philippe, Ednaldo, Letícia, Polyanne, Arthur, Gabriel, Alessandra, Menilla, Iaponira, Deise, Emanuell, Clara e Lucas. E, a todos os demais companheiros cientistas do TECBIOFAR pela força, companheirismo e compreensão diante minhas conversas “sobre si”. Cada um, de forma especial, contribuiu para a conclusão desse trabalho e, conseqüentemente, para minha formação profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), do departamento de Bioquímica/UFRN, na pessoa do professor Dr. Hugo Alexandre que sempre gentilmente cedeu o equipamento para análises do tamanho de partícula e potencial zeta.

Ao Laboratório de Caracterização de Materiais, do departamento de Engenharia de Materiais/UFRN, na pessoa de Igor, pelas análises de AFM.

Ao Laboratório Escola de Farmácia Industrial (LEFI), na pessoa de professor Dr. Túlio e Ednaldo pelas análises de infravermelho (FTIR-ATR).

À Dr. Ana Luíza e à professora Dra. Franceline, membros da banca, por terem aceito o convite.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus demais amigos e familiares, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva.

Tudo o que aparece em nosso caminho faz parte do processo evolutivo de cada indivíduo. A vida não faz nada sem nenhuma finalidade. Todos os fatos que ocorrem, a cada momento, independente da situação, são porque temos condições de aproveitar e amadurecer. Tudo tem sua hora certa. E é com muita felicidade e força daqueles que me acompanharam nessa jornada que dedico com carinho meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O Benznidazol (BNZ) é o único fármaco atualmente disponível para o tratamento de pacientes com doença de Chagas. Apesar de seu uso difundido, revela alta toxicidade, baixa eficácia, dificuldade de atravessar as barreiras biológicas e baixa solubilidade em meio aquoso. O objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas catiônicas, à base de Eudragit E PO, funcionalizadas com ácido siálico e colesterol, potencialmente capazes de direcionar o fármaco para células infectadas pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. Uma otimização sistemática foi realizada usando o método de emulsificação com evaporação de solvente. O efeito das variáveis ao produzir essas nanopartículas foi avaliado pela medição do tamanho médio de partícula, índice de polidispersidade, medições de potencial zeta, microscopia de força atômica (AFM), infravermelho transformada de Fourier (FTIR)-ATR e eficiência de encapsulação. Entre as variáveis inclui a velocidade de agitação, concentração de polímero, agente tensoativo, tipo de injeção da amostra (seringa, bureta ou bomba peristáltica) e do tipo de solvente orgânico utilizado (DCM, DCM: EtOH, DCM: ACE) em diferentes proporções. As nanopartículas apresentaram forma esférica e valores de potencial zeta positivos por volta de +25mV. O DCM: EtOH (50:50 v/v) foi estabelecido para produzir as partículas menores e com boa eficiência de encapsulação de fármaco, tanto para as nanopartículas contendo apenas o BNZ, quanto para as nanopartículas com superfície modificada. Os resultados sugerem a utilização de células de Franz como um método eficiente para avaliar o potencial de liberação *in vitro* das nanopartículas. Todos os sistemas apresentaram viáveis nas menores concentrações utilizadas e apresentaram estabilidade durante seis semanas. As variáveis estudadas foram otimizadas com sucesso para selecionar os parâmetros adequados para a formulação de nanopartículas para a incorporação de BNZ.

Palavras-chave: Nanopartículas Catiônicas. Benznidazol. Emulsificação-evaporação do solvente. Células de difusão Franz. Eficiência de encapsulação.

## ABSTRACT

Benznidazole (BZN) is the only drug currently available for the treatment of patients with Chagas' disease. Despite its widespread use, revealed a high toxicity, low efficiency, difficulty in crossing biological barriers and low solubility in aqueous media. The purpose of this work was to produce cationic nanoparticles functionalized with sialic acid and cholesterol potentially able to target benznidazole (BNZ) to cells infected by *Trypanosoma cruzi* parasite. A systematic optimization was performed using emulsification-solvent evaporation method. The effect of variables when obtaining these nanoparticles were evaluated by measuring mean particle size, zeta potential measurements, atomic force microscopy (AFM), Fourier transforms Infrared (FTIR) –ATR and encapsulation efficiency. The variables included were the speed stirring, concentrations of polymer, surfactant, type of sample injection (syringe, burette an peristaltic pump) and type of used organic solvent (DCM, DCM: EtOH, DCM: ACE) for various ratios. The nanoparticles exhibited spherical shape and positive zeta potential values ranging about +25 mV. The dichloromethane/ethanol (50:50 v/v) was established to produce the smallest particles and with drug loading efficiency, both nanoparticles containing only the drug, and to the nanoparticles surface modified. The results suggest the use of Franz cells as an efficient method for evaluating the potential of nanoparticles in vitro. All systems presented viable in smaller concentrations used and stables for six weeks. The variables studied were successfully optimized to select the appropriate parameters for the formulation of nanoparticles for the incorporation of BNZ.

Keywords: Cationic nanoparticles. Benznidazole. Emulsification-solvent evaporation. Franz diffusion cell. Encapsulation Efficiency.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> -Estrutura química do benznidazol. ....	20
<b>Figura 2</b> -Estrutura química do Eudragit® E PO .....	24
<b>Figura 3</b> -Perfis de absorvância no UV-Vis: ( <b>azul</b> ) Solução de matriz contendo EUD sem o fármaco; ( <b>rosa</b> ) solução BZN ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); ( <b>verde</b> ) solução de matriz polimérica contendo BNZ; ( <b>preta</b> ) solvente (ácido acético). ....	41
<b>Figura 4</b> -Curva analítica do benznidazol. ....	42
<b>Figura 5</b> - Efeito da velocidade de dispersão na distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta. ....	45
<b>Figura 6</b> - Efeito da concentração de copolímero no tamanho da partícula e no potencial zeta .....	46
<b>Figura 7</b> - Efeito da concentração do tensoativo sob o tamanho e potencial $\zeta$ das nanopartículas .....	48
<b>Figura 8</b> - Efeito do tipo de solvente orgânico .....	49
<b>Figura 9</b> - Efeito do tipo de injeção de fase orgânica em fase aquosa .....	50
<b>Figura 10</b> - Eficiência de encapsulação para as nanopartículas em diferentes razões fármaco:copolímero .....	51
<b>Figura 11</b> - Efeito dos agentes funcionalizantes sob o diâmetro de partícula (colesterol-área tracejada vertical e ácido siálico-área tracejada horizontal) e potencial zeta ( $\bullet$ , $\blacktriangle$ ), respectivamente e eficiência de encapsulação do Ácido siálico ( $\blacksquare$ ) e do Colesterol ( $\blacksquare$ ). ....	52
<b>Figura 12</b> - Estudo de estabilidade das nanopartículas contendo o BNZ ( $\bullet$ , $\circ$ );nanopartículas contendo o BNZ com colesterol ( $\blacksquare$ , $\square$ );nanopartículas contendo o BNZ com o ácido siálico ( $\blacktriangle$ , $\Delta$ ). Os símbolos fechados representam o diâmetro e os vazados o potencial zeta. ....	54
<b>Figura 13</b> – Espectro na região IV do BNZ. ....	55
<b>Figura 14</b> -Espetros do IV para os compostos puros.....	56
<b>Figura 15</b> - Espetros das misturas físicas dos constituintes das nanopartículas.....	57
<b>Figura 16</b> - Espectros das nanopartículas: A) NPs sem BNZ (P0), com BNZ (P1), com BNZ e COL (P2) e com BZN e AS (P3). B e C) Bandas específicas entre P0 e P1.....	58
<b>Figura 17</b> -Imagem de AFM de nanopartículas de BNZ em 2D e 3D. A) NPs sem fármaco; B) NPs com BNZ; C) NPs com BZN e AS; D) NPs com BNZ e COL. A topografia foi observada com um deslocamento de frequência de 1HZ e uma amplitude de oscilação do braço de suporte 5000 nm. A escala indica a altura topográfica. ....	60
<b>Figura 18</b> - BNZ liberação cumulativa (%) nanopartículas de BNZ ( $\bullet$ ), nanopartículas de BNZ com AS ( $\blacktriangle$ ) e nanopartículas de BNZ com COL .....	61
<b>Figura 19</b> - BNZ liberado (%) das nanopartículas A) sem funcionalização; B) funcionalizadas com AS e D) funcionalizadas com COL. Os símbolos indicam ( $\bullet$ ) para a liberação do BNZ em função do tempo e ( $\circ$ ) para a curva $\ln Q_t / Q_\infty$ uma função de $\ln t$ , de acordo com o modelo Korsmeyer-Peppas ( $n = 3$ ).....	63
<b>Figura 20</b> - Viabilidade celular relativa das nanopartículas sem fármaco (SF), com Fármaco (BNZ), com fármaco funcionalizadas com ácido siálico (AS) e com fármaco funcionalizadas com colesterol (COL). ....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Resultados experimentais do estudo de validação para análise do BNZ através do método espectrofotométrico UV-Vis para precisão, exatidão e robustez. ....	44
<b>Tabela 2-</b> Modelos matemáticos usados para descrever a cinética de liberação do BNZ .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA - Análise de variância
- ACE - Acetona
- AFM - Microscopia de força atômica
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AS - Ácido siálico
- BNZ - Benznidazol
- CMD – Concentração média determinada
- CV% - Coeficiente de variação
- COL - Colesterol
- DLS - *Dynamic Ligth Scaterring*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DP - Desvio padrão
- DST- Doenças Sexualmente Transmissíveis
- DRX – Difractometria de raios-X
- EUD – Eudragit<sup>®</sup> E PO
- EE% - Eficiência de encapsulação
- ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- EtOH - Etanol
- FITR – Fourier Infrared Transformed
- IFN- $\gamma$  – Interferon gama
- ICH – Conferência Internacional de Harmonização
- IDP – Índice de Polidispersidade ou polidispersão
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz
- IV – Infravermelho
- L15- Meio Leibovitz

LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

MF - mistura física

MTT - 3-(4,5-dimetil) difenil tetrazólio

Neu5Ac - Ácido 2-deoxi-2,3-didehidro-N-acetilneuramínico

NPs - Nanopartículas

PMMA - Polimetilmetacrilato

OMS – Organização Mundial de Saúde

PVA – álcool polivinílico

rcf - Relative Centrifugal Force

SFB - Sore fetal bovine

TS - Trans-sialidase

UV-vis - Ultravioleta Visível

WHO - *World Health Organization*

$\zeta$  - Zeta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
2.1 Doença de Chagas .....	18
2.2 Benznidazol.....	20
2.3 Nanopartículas.....	21
2.4 Polímero .....	23
2.5 Funcionalização da superfície da partícula .....	24
2.6 Emulsificação por Evaporação do Solvente.....	26
2.7 Métodos utilizados para a caracterização das nanopartículas .....	27
3 OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 JUSTIFICATIVA.....	30
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
5.1 Reagentes, materiais e equipamentos.....	31
5.1.1 Reagentes e materiais.....	31
5.1.2 Equipamentos .....	31
5.2 Métodos.....	32
5.2.1 Validação do método espectrofotométrico UV-Vis para o doseamento do BNZ .....	32
5.2.1.1 Especificidade e seletividade .....	32
5.2.1.2 Curva Analítica .....	33
5.2.1.3 Linearidade e intervalo.....	33
5.2.1.4 Precisão .....	33
5.2.1.5 Exatidão.....	34
5.2.1.6 Robustez.....	34
5.2.1.7 Análise estatística da validação.....	35
5.3 Preparação das nanopartículas .....	35
5.3.1 Funcionalização das superfície das nanopartículas .....	36
5.3.2 Preparação das nanopartículas sólidas.....	36
5.4 Caracterização das das nanopartículas .....	36
5.4.1 Medidas de potencial Zeta ( $\zeta$ ), tamanho de partícula e índice de polidispersabilidade (IPD) .....	36
5.4.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) -ATR.....	37
5.4.3 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	37
5.4.4 Estudo de estabilidade .....	37

5. 4. 5 Eficiência de Encapsulação (EE%) .....	38
5. 4. 6 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	38
5. 4. 7 Estudo de Viabilidade celular .....	39
5.5 Análise estatística.....	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
6.1 Validação do método espectrofotométrico UV-Vis .....	40
6.1.1 Especificidade e seletividade .....	40
6.1.2 Curva analítica.....	41
6.1.3 Precisão.....	42
6.1.4 Exatidão .....	43
6.1.5 Robustez .....	43
6.2 Caracterização das nanopartículas.....	45
6.2.1 Efeito da velocidade de dispersão.....	45
6.2.2 Efeito da concentração do polímero .....	46
6.2.3 Efeito da concentração do tensoativo .....	47
6.2.4 Influência do tipo de solvente.....	48
6.2.5 Efeito do tipo de injeção de amostra.....	49
6.2.6 Eficiência de Encapsulação .....	50
6.2.7 Funcionalização da superfície das partículas e eficiência de encapsulação.....	52
6.2.8 Estudo de estabilidade .....	53
6.2.10 Análise do Infravermelho (FTIR).....	54
6. 9. 11 Análise da Microscopia de Força Atômica (AFM).....	58
6.9.12 Estudo de Liberação <i>in vitro</i> .....	61
6.2.13 Estudo de viabilidade celular.....	64
7 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

Benznidazol (BNZ) é o único fármaco atualmente disponível para o tratamento da doença de Chagas, prevalente e importante doença parasitária negligenciada no mundo, transmitida pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. No entanto, este fármaco tem baixa solubilidade em meio aquoso, elevada toxicidade, além de não ser totalmente eficaz na fase crônica, em que o parasita encontra-se na fase intracelular, principalmente devido à dificuldade de superar as membranas biológicas. (ROMERO; MORILLA, 2010; SOARES SOBRINHO et al., 2011).

Vários sistemas de liberação têm sido utilizados como estratégia para aumentar a eficiência de fármacos, o que permite uma melhor utilização de moléculas com propriedades indesejáveis. Entre as estratégias inclui a utilização de sistemas coloidais, tais como emulsões inversas e múltiplas, micro e nanogéis, lipossomas, nanopartículas (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014). Estas têm propriedades interessantes, tais como o tamanho na escala nanométrica, que permite a modificação de qualquer propriedade do material, tais como a capacidade de atravessar as barreiras biológicas, o direcionamento para determinados tipos de células particulares ou para locais intracelulares, permitindo uma liberação prolongada quando administrada em determinados tecidos.

A produção de nanopartículas pode ser realizada pelo método de emulsificação com evaporação do solvente, nanoprecipitação, *salting out*, emulsificação com difusão solvente. Entre estes, a emulsificação com evaporação do solvente permite a encapsulação de fármacos não-polares como praziquantel, piroxicam, carbamazepina. Assim, os parâmetros importantes específicos devem ser otimizados a fim de obter nanopartículas com estreita distribuição de tamanho e alta carga de fármaco, especialmente quando essas formulações são planejadas para administração parenteral, em que a manutenção do tamanho médio de partícula é um fator crítico, especialmente quando se visa atingir algum órgão-alvo (SCHAFFAZICK et al., 2003; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Entre os parâmetros têm-se a razão de polímero / tensioativo / fármaco, tipo de injeção da amostra e tipo de solvente orgânico.

As características de superfície são certamente o principal parâmetro envolvido com o direcionamento do fármaco e captação celular (FECZKÓ et al., 2011). Assim, a capacidade de nanopartículas catiônicas biodegradáveis atravessarem barreiras biológicas é uma opção para que o medicamento alcance com êxito os locais da doença. Entre os materiais usados para este propósito, um copolímero catiônico, Eudragit E PO, com base em metacrilato, tem propriedades interessantes, tais como biocompatibilidade, baixa toxicidade, bem como a sua capacidade de adsorção eficiente (GUZMÁN; MANZO; OLIVERA, 2012; MOUSTAFINE; ZAHAROV;

KEMENOVA, 2006a). Devido à presença de grupos amino protonados, a classe desses copolímeros pode ser usada para produzir nanopartículas catiônicas capazes de se evadir dos macrófagos e facilitar a interação com membranas biológicas do fosfolípido de membrana (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOPPIMATH et al., 2001a; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Para alguns sistemas, embora se utilize polímeros catiônicos, é necessário modificar algumas características das partículas para aumentar o direcionamento, modificando a superfície das partículas com substâncias fundamentais, como ácido fólico, ácido siálico, colesterol ou triglicerídeos que são utilizadas na síntese de DNA, e lipoproteínas sendo captadas mais rapidamente por células com alto anabolismo como o caso de células cancerígenas ou infectadas (SHIOKAWA et al., 2005).

Para prever o comportamento desses sistemas nanoparticulados *in vivo* e também para se ter conhecimento da sua estabilidade, algumas caracterizações são feitas, como análises de tamanho de partícula, potencial zeta, análise de infravermelho, microscopia de força atômica, cinética de liberação *in vitro*, testes de toxicidade.

Foi feita uma busca em todas as bases de dados científicas e constatou-se que até o mês de maio de 2015 haviam sido publicados 908 artigos contendo o BNZ, entre estes apenas 6 abordaram sobre nanopartículas e, entre estes, nenhum possuía uma abordagem experimental semelhante, utilizando nanopartículas catiônicas para liberação modificada BNZ.

Portanto, este estudo centrou-se no desenvolvimento, otimização e caracterização de nanopartículas catiônicas, funcionalizadas com ácido siálico e colesterol, para liberação modificada do benznidazol, obtidas pelo método de emulsificação com evaporação de solvente como novo potencial para o tratamento da doença de Chagas, pois além garantir uma nova forma de administração do fármaco, conduz essencialmente a obtenção de um insumo inovador com potencial para depósito de patente e consequente produção científica de alto impacto.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença causada principalmente pelo protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, incluindo o Brasil, onde é principalmente transmitida aos seres humanos por contato com fezes de triatomíneos, conhecidos como "barbeiros" (PELIZZARO-ROCHA et al., 2010; RASSI JR; RASSI; MARINETTO, 2010). Descoberta em 1909 em Minas Gerais, por Carlos Chagas, médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), a doença tornou-se objeto de uma larga tradição de pesquisa no Brasil e no exterior (KROPF, 2005; PARKER; SETHI, 2011). Segundo a *World Health Organization* (WHO) (2015), mais de 11 milhões de pessoas foram infectadas pelo protozoário, principalmente na América Latina; mais de 25 milhões de pessoas correram risco de infecção; e em 2008 mais de 10 mil pessoas morreram em consequência desta doença. Na América Latina, os anos de vida perdidos, ajustados por incapacidade/deficiência, apresentaram-se em maior escala devido à doença de Chagas do que à meningite, a doenças sexualmente transmissíveis (DST), a hepatites B e C, e à malária (ROMERO; MORILLA, 2010).

A doença de Chagas foi classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada, por ser mais prevalente em países em desenvolvimento e apresentar poucas alternativas de tratamento. No Brasil os principais focos do vetor transmissor desta infecção, o *Triatoma infestans*, encontram-se em parte de Goiás, sul de Tocantins, na região do Além São Francisco, na Bahia, no norte do Rio Grande do Sul e no sudeste do Piauí (VINHAES; DIAS, 2000). Os movimentos de população em grande escala têm expandido as áreas onde casos da doença são encontrados e estes passaram a incluir muitos países da Europa e os Estados Unidos.

Acredita-se que a doença de Chagas tenha se iniciado há milhões de anos como uma enzootia de animais silvestres, transmitida entre os animais por vetores da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* (HOARE, 1972). Estes animais (tatus, gambás, roedores) conviviam com triatomíneos silvestres (vetores), e através de um mecanismo biológico entre eles circulava o *T. cruzi*. Com a chegada do homem e dos processos de colonização, em muitos lugares aconteceram desequilíbrios ecológicos (desmatamentos, queimadas) e os barbeiros foram desalojados, invadindo as habitações rústicas e pobres dos lavradores e colonos. A doença chegou ao homem e aos mamíferos domésticos através dos

chamados barbeiros domésticos e peridomésticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005, 2012; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Mais de 130 espécies de triatomíneos, potenciais vetores do *T. cruzi*, são conhecidos. A grande maioria vive em associação com aves e mamíferos silvestres. Destacam-se como de importância em saúde pública pela sua capacidade de domiciliação e antropofílica as seguintes espécies: *T. infestans*, *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida*, *T. maculata*, *T. phyllosoma* e *R. palescens* (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

O mecanismo principal de transmissão da doença de Chagas é através do vetor, onde a infecção ocorre pela penetração do *T. cruzi* na forma de tripomastigotas metacíclicos (eliminados nas fezes ou urina de triatomíneos, durante o hematofagismo), em solução de continuidade da pele ou mucosa íntegra. Além deste mecanismo, a transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidentes de laboratório, transmissão oral, coito e os transplantes, também podem ser citados como formas de transmissão desta endemia (RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Os sinais da infecção aparecem no próprio lugar onde se deu a contaminação pelas fezes do inseto. Estes sinais surgem mais ou menos de 4 a 6 dias após o contato do barbeiro com a sua vítima. Os tripanossomas, eliminados pelo barbeiro e introduzidos nos tecidos da região, determinam uma inflamação que marca a "porta de entrada" da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Portanto, a fase aguda da doença inicia-se através das manifestações locais na pele (chagoma de inoculação) ou na conjuntiva (sinal de Romana) (RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010) persistindo durante cerca de dois meses, com uma mortalidade global de 2 a 8%, principalmente entre as crianças. Na fase crônica, a maioria dos pacientes permanece assintomática (dura de 10 a 30 anos), com cerca de 20% dos casos desenvolvendo doença digestiva, perturbações neurológicas, miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepato-esplenomegalia. No entanto, autópsias revelam que os pacientes chagásicos apresentam vasos sanguíneos em invejável estado, sem resquícios de placas de colesterol, o que gera curiosidade em alguns pesquisadores (SOARES SOBRINHO et al., 2011).

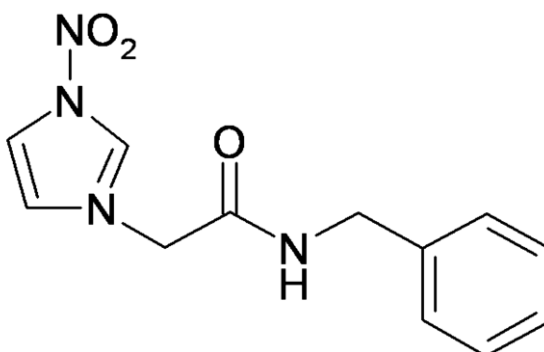
O diagnóstico da doença para a fase aguda é feito através de microscopia com identificação da forma tripomastigota em esfregaço de sangue periférico. No entanto, na fase crônica, devido ao declínio da parasitemia sanguínea, o diagnóstico é realizado com a confirmação da presença de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, através de dois testes sorológicos

diferentes, como por exemplo ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) e imunofluorescência indireta (PARKER; SETHI, 2011).

O Atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético e o cloreto de mercúrio foram os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento específico da doença de Chagas, porém todos estes compostos se mostraram ineficazes no tratamento proposto (COURA; DE CASTRO, 2002). Por volta do início da década de 70, surgiram dois compostos com novas perspectivas, tanto pela eficácia na fase aguda quanto pela tolerância: o nifurtimox da Bayer (Lampit<sup>®</sup>) e o benznidazol da Roche (Rochagan<sup>®</sup>) (DIAS et al., 2009). No entanto, na década de 1980, o nifurtimox teve seu uso interrompido no Brasil seguido de outros países da América do Sul, por apresentar muitos efeitos adversos secundários e pelo desenvolvimento de cepas resistentes. O desinteresse do laboratório farmacêutico em continuar a produção de um medicamento não lucrativo também foi um fator de grande relevância para o fim da comercialização deste composto (MEZENCEV et al., 2009; SOARES SOBRINHO et al., 2007).

## 2.2 Benznidazol

A molécula de Benznidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida) apresenta caráter limitante devido a sua baixa solubilidade e alta toxicidade. Entretanto é o único fármaco atualmente disponível para o tratamento da doença de Chagas no Brasil (SOARES SOBRINHO et al., 2011). Sua molécula é formada por um grupo imidazol, um grupo benzeno e um grupo central acetamida (Figura 1). Em abril de 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação do benznidazol (BNZ) foram cedidos, pela Roche, ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006).



**Figura 1**-Estrutura química do benznidazol.

Alguns estudos indicam que o BNZ atua através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos (URBINA, 2010). O grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) presente nesta molécula é reduzido ao grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo  $\text{R-NO}_2$ , levando à formação de um intermediário nitro radicalar ( $\text{R-NO}_2^-$ ), com subsequente formação de hidroxilamina ( $\text{R-NHOH}$ ). O radical nitro formado estaria envolvido com o efeito tripanocida do BNZ, através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* (DNA e citocromo P450). Foi verificado também que o BNZ aumenta a fagocitose e lise celular do *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ), e inibe o crescimento do *T. cruzi* através da enzima NADH-fumarato redutase (DIAS et al., 2009).

No mercado, o BNZ está disponível na forma de comprimidos de 100 mg, sendo usualmente recomendada a dose de 5-7 mg/kg/dia durante um período de tratamento entre 30 e 60 dias (SALOMON, 2012). É absorvido por via oral e sua concentração máxima sanguínea é atingida de 2 a 4 horas, com meia vida de 12 horas, sendo seus metabólitos eliminados pela urina e fezes. No entanto, este fármaco apresenta algumas restrições, como a baixa eficácia na fase crônica da doença, significativas variações regionais na eficácia, devido ao surgimento de resistência ao *T. cruzi*, alta taxa de abandono do tratamento, devido aos efeitos colaterais causados, longo período de tratamento (30 a 60 dias) e a inexistência de formulação de uso pediátrico (MEZENECV et al., 2009).

O BNZ possui baixa solubilidade, sendo, portanto, fracamente solúvel em água e nos fluidos aquosos. Sua toxicidade pode ter como causa principal a interação de seus metabólitos com componentes celulares. Também possui baixa biodisponibilidade, principalmente diante a dificuldade de ultrapassar barreiras biológicas. Com o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para melhorar o direcionamento, este fármaco tem sido o alvo de alguns pesquisadores na área de tecnologia farmacêutica (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; SALOMON, 2012).

### **2.3 Nanopartículas**

O uso de sistemas de liberação de fármacos permite um aumento da eficiência de fármacos, permitindo o melhor aproveitamento de moléculas com propriedades indesejáveis como baixas solubilidades, toxicidade e ação inespecífica (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). O uso de sistemas nanocarreadores envolve uma ampla área de estudo e tem reunido muitos

esforços, os quais estão representados pelas novas estratégias para a veiculação de fármacos. Entre as estratégias inclui o uso de sistemas coloidais como as emulsões múltiplas e inversas, micro e nanogéis, lipossomas e as nanopartículas (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014).

Dentre estes sistemas de liberação de fármacos, destacam-se os sistemas matriciais poliméricos amplamente aplicados na forma de nanopartículas, que apresentam propriedades interessantes como o tamanho em escala nanométrica (geralmente desejável em abaixo de 200 nm), permitindo a modificação de propriedade dos materiais, como a capacidade de atravessar barreiras biológicas, o direcionamento para certos tipos de células ou para determinados locais intracelulares, além de permitir uma liberação prolongada quando administradas em determinados tecidos.

Estruturalmente, as nanopartículas podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural e podem ser obtidas de acordo com o método de preparo (NG et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003)

As nanocápsulas constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, nas quais é possível se identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido envolto por um invólucro polimérico, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar disperso ou solubilizado no seu interior (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014)

Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Ambas apresentam propriedades bastante interessantes, tais como: o tamanho nanométrico, que possibilita atravessar a membrana e acumular no interior das células; a possibilidade de alterar a carga e a constituição de sua superfície, o que está diretamente relacionado com a especificidade de sua interação com a membrana celular (DAVIS; CHEN; SHIN, 2008; NG et al., 2010).

As nanopartículas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis ocupam posição de destaque, as quais apresentam a vantagem de manipular suas propriedades físico-químicas de acordo com a composição dos monômeros constituintes e assim interagir com fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, neutros ou com carga. Isto permite uma diversidade de aplicações como o tratamento de tumores, câncer, AIDS, diabetes, malária e tuberculose (DAVIS; CHEN; SHIN, 2008). As características destes materiais permitem sua aplicação em formulações de uso oral, oftálmico, sistemas bioadesivos e principalmente parenteral (HASMAM et al., 2009).

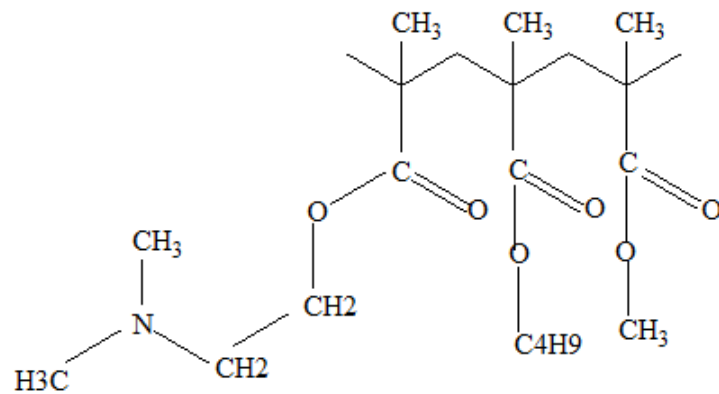
As vantagens da utilização de nanopartículas incluem a liberação controlada e/ou prolongada da substância nelas incorporadas, a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local de ação, o aumento da penetração intracelular e o aumento da atividade farmacológica.

## 2.4 Polímero

Derivados de ácido acrílico, tais como poli (alquilcianoacrilatos) e poli (metilmetacrilatos) são os polímeros mais comumente empregado em preparação de nanopartículas (HOFFMANN et al., 1997; LANGER et al., 1997) Devido à sua hidrofobicidade, as nanopartículas contendo esse polímero mostraram apenas baixa adsorção para fármacos iônicos hidrofílicos. Este problema foi superado pelo emprego de diferentes derivados do copolímeros de ácido acrílico (LANGER et al., 1997). Um dos derivados foi o Polimetilmetacrilato (PMMA), que possuem propriedades interessantes, tais como biocompatibilidade, baixa toxicidade, bem como a sua capacidade de adsorção eficiente (GUZMÁN; MANZO; OLIVERA, 2012; MOUSTAFINE; ZAHAROV; KEMENOVA, 2006b).

O Eudragit E PO (EUD) (figura 2) é um polímero da classe metacrilado, como o PMMA com base em metacrilato dimetilaminoetilo, metacrilato de butilo, metacrilato de metilo que merece destaque diante suas vantagens em sistemas de liberação modificada. A presença de grupos amino protonados, nessa classe de copolímero pode ser usado como estratégia na produção de nanopartículas catiônicas, pois aumenta a solvatação e diminui a opsonização das partículas no organismo através da capacidade de evadir-se dos macrófagos, facilitando a interação com os fosfolípido de membrana (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOPPIMATH et al., 2001b; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Esses sistemas poliméricos possuem grande potencial no fornecimento de novas vias de administração, tais como formas de dosagem oral, direcionamento para órgãos e tecidos e de longa ação na forma parenteral (LIN; NG; WANG, 2005).



**Figura 2**-Estrutura química do Eudragit<sup>®</sup> E PO

Cabe ressaltar que, quando estas formulações são planejadas para a administração parenteral, a manutenção do tamanho médio das partículas é um fator crítico, principalmente quando o direcionamento do fármaco para algum tecido é desejável (SCHAFFAZICK et al., 2003; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

## 2.5 Funcionalização da superfície da partícula

Para determinados tecidos o direcionamento do fármaco pode ocorrer de forma passiva e/ou ativa. O direcionamento passivo ou natural pode ocorrer quando o sistema é reconhecido como um xenobiótico e assim é captado por tipos celulares específicos, permitindo o direcionamento ao sistema fagocítico mononuclear. Outro exemplo é o fato de alguns tecidos possuírem capilares fenestrados, com espaços intercelulares epiteliais maiores que capilares normais, os quais permitem a passagem e o acúmulo destes sistemas quando injetados na corrente circulatória em determinados tecidos, como no caso de alguns tumores (DAVIS; CHEN; SHIN, 2008).

O direcionamento ativo geralmente envolve a funcionalização dos sistemas, a qual pode ocorrer pela inclusão de determinados ligantes à superfície das partículas e assim pode alterar o perfil de distribuição devido ao reconhecimento por receptores das células alvo (BRUXEL et al., 2012). Outra estratégia de direcionamento ativo inclui o chamado “cavalo de tróia”, na qual as partículas com fármaco são carregadas com substâncias fundamentais para a estruturação de novas células em desenvolvimento como por exemplo ácido fólico, colesterol ou triglicerídeos que são utilizadas na síntese de DNA, e lipoproteínas sendo captadas mais rapidamente por

células com alto anabolismo como o caso de células cancerígenas ou infectadas (SHIOKAWA et al., 2005).

Na doença de Chagas, substâncias promissoras para a funcionalização são o ácido siálico e o colesterol. O mais comum dos ácidos siálicos é o ácido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac), considerado o precursor dos outros membros da família como, por exemplo, do ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e do ácido 2-deoxi-2,3-didehidro-N-acetilneuramínico (Neu5Ac2en) (BLUME et al., 2007; SCHAUER, 2004).

Em *T. cruzi* o ácido siálico foi primeiramente descrito na superfície de formas epimastigotas através do uso de lectinas e métodos colorimétricos. A presença de ácido siálico em formas epimastigotas foi comprovada por cromatografias em camada delgada e gás-líquida e espectrometria de massas. Há duas décadas, Pereira et al (1983) observaram a capacidade de tripomastigotas liberarem Neu5Ac de eritrócitos humanos e de glicoproteínas plasmáticas, descrevendo uma atividade, estágio específica, neuraminidásica (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Em 1985, Previato et al caracterizaram, pela primeira vez, a capacidade de formas epimastigotas de incorporarem ácido siálico em moléculas de superfície do parasito, utilizando como substrato doador sialoglico conjugados exógenos e sugeriram que a incorporação do ácido siálico às glicoproteínas da superfície do *T. cruzi* não se processava pela via convencional, onde o CMP-Neu5Ac é o substrato doador de ácido siálico. Esses resultados sugeriram, fortemente, que, em *T. cruzi*, a sialilação de glicoproteínas ocorria por uma nova rota metabólica, envolvendo reações de trans-glicosilação para ácido siálico. A capacidade de incorporação de ácido siálico em tripomastigotas foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vivo* foi demonstrada a incorporação de Neu5Gc à superfície de formas tripomastigotas obtidas de camundongos infectados. Finalmente, a atividade trans-glicosilase para ácido siálico foi caracterizada como a enzima trans-sialidase (TS) responsável pela transferência de ácido siálico de substratos exógenos para glicoproteínas presentes na superfície do *T. cruzi* formando o epitopo Ssp-3 (AGUSTÍ; GIORGI; DE LEDERKREMER, 2007; CAMPO et al., 2012).

Na doença de Chagas, o parasita utiliza a TS para captar ácido siálico da membrana das células humanas, já que o parasita necessita da substância para viver, mas não é capaz de produzir em seu metabolismo. No entanto, o ácido siálico da membrana das células humanas também costuma servir como um gancho molecular que bactérias utilizam para se prender à parede interna dos vasos, fato que pode estar associado à piora das condições nos pacientes com colesterol alto (DIAS et al., 2009). Segundo pesquisadores tratamento com a trans-sialidase em

coelhos que ingeriram uma dieta rica em colesterol preservou os animais de problemas vasculares e fez os danos às artérias regredirem. Acredita-se que a trans-sialidase serviu para desprender as bactérias associadas à formação das placas, pois além de “quebrar” o ácido siálico, conseguiu exibir a mesma ação sobre o colesterol.

Com a identificação dos genes que codificam a TS em *T. cruzi* ficou claro que as duas atividades enzimáticas eram encontradas na mesma proteína. Esses estudos demonstraram que o sítio catalítico estava localizado no domínio N-terminal de um antígeno denominado SAPA (Shed Acute Phase Antigen) presente no soro de pacientes infectados com *T. cruzi* e que, o domínio C-terminal do antígeno SAPA continha unidades repetitivas de amino ácidos que geravam forte resposta imune durante a fase aguda da doença de Chagas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

As sialidases ou neuraminidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ácido siálico. Em mamíferos as sialidases modulam a distribuição de ácido siálico na superfície celular com efeitos no sistema imune; na meia vida de células circulantes e apoptose. São encontradas em muitos microrganismos patogênicos e muitas vezes estão associadas à virulência desses patógenos (DIAS et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

Diversos trabalhos sugerem que a adesão e a penetração do *T. cruzi* na célula hospedeira são moduladas pela atividade sialidase/trans-sialidase. Contudo, a ausência de ácido siálico na superfície do parasito, aumentando a invasão das células hospedeiras por tripomastigotas foi verificada por vários autores. De acordo com esses resultados, Yoshida et al (2009) demonstraram que a remoção do ácido siálico da superfície de tripomastigotas metacíclicos aumentou a interação do parasito com células HeLa.

Analisando os resultados de alguns autores, uma estratégia que pode ser utilizada para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas é desenvolver sistemas nanocarreadores funcionalizados com ácido siálico e colesterol para um melhor direcionamento ao órgão-alvo e servir como uma forma de atrair o parasita até o fármaco.

## **2.6 Emulsificação por Evaporação do Solvente**

Dentre uma diversidade de métodos empregados para a preparação de nanopartículas poliméricas, a emulsificação com evaporação de solvente é certamente a mais consolidada, permitindo usar a quase emulsificação, emulsificação simples ou dupla de acordo com a

solubilidade do princípio ativo e do polímero, assim como a razão fármaco/polímero e via de administração (HASMAM et al., 2009).

Esta técnica geralmente inclui o uso de uma fase orgânica contendo um solvente apolar em que o polímero é dissolvido, a qual é emulsificada no interior de uma fase aquosa contendo um agente tensoativo, seguida da evaporação com a co-precipitação das partículas e eliminação dos resíduos de solvente ou tensoativos. Os fármacos não polares são adicionados na fase orgânica, enquanto os fármacos hidrofílicos, peptídeos ou proteínas podem ser adicionados em uma primeira emulsão água em óleo (dupla emulsão) ou adsorvidos na superfície das partículas formadas. Por esta técnica é possível apenas a formação de nanoesferas, pois o fármaco fica disperso na matriz polimérica (NG et al., 2010; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Desta forma algumas variáveis importantes devem ser padronizadas na obtenção de nanopartículas por emulsificação com evaporação de solvente como o tipo de polímero, tipo de solvente, razão fármaco/polímero, razão fase interna/ fase externa e o tipo de tensoativo e concentração utilizada. Dentre alguns agentes tensoativos estão o álcool polivinílico (PVA), os poloxâmers ou ainda polissorbatos, monoésteres do sorbitano e os fosfolípídeos (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). O PVA, os polaxamers e os fosfolípídeos possuem a vantagem de uso parenteral devido a menor toxicidade (NG et al., 2010).

Para solubilizar os polímeros por essa técnica, geralmente são utilizados solventes clorados, como o cloreto de metileno (diclorometano), clorofórmio ou mistura destes solventes com outros menos apolares devido a capacidade de solubilização, apolaridade e ao seu baixo ponto de ebulição. A maior desvantagem destes solventes orgânicos reside na sua toxicidade, os quais devem ser removidos totalmente do sistema (SCHAFFAZICK et al., 2003).

## **2.7 Métodos utilizados para a caracterização das nanopartículas**

A caracterização das nanopartículas é muito importante para prever o comportamento das partículas *in vivo* e também para se ter conhecimento da sua estabilidade. Diversos fatores podem interferir no modo de liberação da substância ativa, tais como o diâmetro da partícula, o modo de associação do ativo com a matriz polimérica, valor do potencial zeta, tipo tensoativos utilizados. Algumas caracterizações de nanopartículas realizadas são de espectroscopia de absorção UV-VIS; tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta, por meio de Dynamic Light Scattering (DLS); técnicas de microscopia como força atômica (AFM) que fornece informações da estrutura tridimensional e imagens topográficas em escala nanométrica.

Para caracterização das nanopartículas sólidas utiliza-se, na maioria das vezes, técnicas de Difração de Raios-X (DRX) para avaliar a cristalinidade do sistema; Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para avaliar se há interação entre os componentes dos sistemas. Além destas técnicas clássicas, recentemente outras técnicas, como espectroscopia de Raman, eletroforese capilar, potenciometria, calorimetria de titulação isotérmica, dicroísmo circular, entre outras, também vem sendo utilizadas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Obter nanopartículas catônicas a base de Eudragit E PO, contendo benznidazol, funcionalizadas com o ácido siálico e colesterol, pela técnica de emulsificação com evaporação de solvente para possibilitar um potencial direcionamento do fármaco para as células infectadas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito das variáveis na obtenção de nanopartículas pela técnica de emulsificação com evaporação de solvente:
  - ✓ Efeito do tipo de polímero;
  - ✓ Efeito da razão fármaco/polímero;
  - ✓ Efeito da razão de fase interna/fase externa;
  - ✓ Efeito do tipo e concentração de agente tensoativo (PVA);
  - ✓ Efeito do tipo de solvente orgânico;
  - ✓ Efeito das substâncias de funcionalização (ácido siálico e colesterol);
  - ✓ Desenvolvimento e validação da metodologia analítica utilizada para determinação analítica do benznidazol.
  
- Caracterizar os sistemas obtidos incluindo:
  - ✓ Determinação da distribuição e do tamanho de partículas utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz “Dynamic Light Scattering”;
  - ✓ Determinação do potencial zeta;
  - ✓ Análise quantitativa de fármaco;
  - ✓ Microscopia de Força Atômica (AFM);
  - ✓ Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)-ATR;
  - ✓ Estudo de liberação *in vitro*;
  - ✓ Estudo de Viabilidade celular.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

Devido a importância da doença de Chagas para o sistema de saúde do Brasil e de países em desenvolvimento, a pesquisa aplicada para as doenças negligenciadas vem sendo estimulada pelo Ministério de Saúde do Brasil e pelo Ministério de Ciência e Tecnologia em editais sucessivos abertos anualmente, como o Edital MCT/CNPq/CT-Saúde/MS/ SCTIE/DECIT Nº 034/2008. Estes recursos estão sendo aplicados na pesquisa básica para o melhor entendimento e, principalmente, no desenvolvimento de vacinas e novas formas de tratamento mais eficazes. A aplicação da Nanotecnologia Farmacêutica para o aumento da eficácia do tratamento desta doença é muito relevante no âmbito farmacêutico e da saúde, pois além de possibilitar a obtenção de novos produtos permite o treinamento e formação de recursos humanos nessa área de pesquisa.

Assim, a obtenção de nanopartículas catiônicas para liberação modificada de BNZ, funcionalizadas com ácido siálico e colesterol, constitui uma alternativa interessante para o aumento da eficiência terapêutica deste fármaco, pois além garantir uma nova forma de administração do fármaco conduz essencialmente a obtenção de um insumo potencialmente inovador que possibilite futuramente a obtenção de uma formulação de uso parenteral.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Reagentes, materiais e equipamentos

#### 5.1.1 Reagentes e materiais

- Água purificada ( $< 1,0 \mu\text{S cm}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) obtida em equipamento de osmose reversa (modelo OS50 LX, Gehaka, São Paulo, SP, Brasil);
- Eudragit<sup>®</sup> E PO (EUD, Röhm Pharma Polymers, Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Alemanha) com uma massa molar de  $0,47 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , segundo o fabricante;
- Álcool polivinílico (PVA, Figura X.a, Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) apresentando um grau de hidrólise entre 86,5% e 89,5%, segundo o fabricante. Sua massa molar viscométrica média ( $2,00 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ ) foi determinada pelo método de viscometria, utilizando a equação de Mark-Houwink-Sakurada;
- Benznidazol (BNZ, 99,33%, LAFEPE, Recife, PE, Brasil);
- Ácido acético glacial (P.A., Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil);
- Acetona (ACE, P.A., Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil);
- Etanol (EtOH, 96 %, Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil);
- Diclorometano (DCM, P.A., Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil);
- Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
- Hidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
- Hidróxido de sódio (NaOH, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
- Ácido Siálico (N-acetil-neuramínico, Neu5Ac, Figura X.b,  $> 98\%$ , CarboSynth, Compton, Berkshire, Inglaterra);
- Colesterol (Figura X.c,  $\geq 92,5 \%$ , Vetec<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
- Membranas filtrantes de acetato de celulose com diâmetro de poros de  $0,45 \mu\text{m}$  (Sartorius, Göttingen, Niedersachsen, Alemanha).

#### 5.1.2 Equipamentos

- Balança Gehaka, AG-200

- Centrífuga 5418R - Eppendorf®
- Células do tipo Franz Crown Scientific - Sommerville
- Concentrador a vácuo CentriVap Cold Trap -Labconco
- Espectrofotômetro UV visível Thermo Fisher Scientific, Evolution 60S;
- Infravermelho Transformado de Fourier (FTIR – ATR) -SHIMADZU IR Prestige 21
- Leitor de ELISA Epoch - BioTek
- Microscópio de Força Atômica (AFM), SPM – 9700 - Shimadzu
- pHmetro Gehaka, PG 1800
- Ultrassom Unique, Ultra Cleaner 1400
- Ultra-turrax T 18 - Ika
- Vidrarias analíticas

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Validação do método espectrofotométrico UV-Vis para o doseamento do BNZ

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, foi realizada a validação do método espectrofotométrico na região do ultravioleta-visível para a quantificação do BNZ na presença do solvente e matérias-primas utilizados no estudo em questão. A metodologia foi validada de acordo com os parâmetros preconizados pela Resolução-RE n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e pelo Guia do *International Conference on Harmonization* (ICH) (Ich 2005).

#### 5.2.1.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade do método foram avaliadas através da comparação dos espectros de absorção obtidos na região de ultravioleta-visível apresentando uma faixa de comprimento de onda entre 200 a 400 nm da solução padrão de BNZ 500 µg mL<sup>-1</sup>, adicionando a ela soluções contendo os diferentes excipientes utilizados durante o estudo de solubilidade: 1) solução de EUD e PVA (componentes da matriz); 2) solução de BNZ; (3) ácido acético a 0,1N. Todas as soluções foram preparadas com ácido acético a 0,1N que foi a concentração passível a dissolver todos os componentes da matriz e o fármaco.

#### 5.2.1.2 Curva Analítica

No preparo da solução estoque de BNZ pesou-se 25 mg do fármaco e foi acrescentado 30 mL de ácido acético. A solução foi homogeneizada com bastão de vidro até total dissolução do fármaco. Em seguida, a solução foi transferida para um balão de 50 mL e o volume foi completado com ácido acético, o que resultou em uma concentração de 500 µg/mL. Alíquotas de 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL da solução preparada foram adicionadas a balões volumétricos de 10 mL, as quais corresponderam, respectivamente, às seguintes concentrações: 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 e 40 µg de fármaco por mL da solução (n=3). Posteriormente o volume foi completado até a marca do balão com água destilada. A varredura do comprimento de onda foi realizada no espectrofotômetro UV-Vis.

#### 5.2.1.3 Linearidade e intervalo

A linearidade do método foi verificada a partir do valor do coeficiente de correlação calculado após a obtenção da curva analítica do BNZ. O intervalo também foi estabelecido usando os valores de concentração obtidos pela curva analítica.

#### 5.2.1.4 Precisão

Na precisão podem ser avaliados os critérios de repetibilidade, precisão intermediária e de reprodutibilidade. Neste estudo, a precisão foi avaliada quanto à repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (intercorrídas). Para realização da precisão foi preparada uma solução estoque de BNZ de 500 µg·mL<sup>-1</sup>. Alíquotas de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,7 mL da solução estoque foram transferidas para balões de 10 mL, obtendo-se concentrações diferentes (5, 10, 20, 30 e 35 µg·mL<sup>-1</sup>). O volume foi completado com a solução de EUD em ácido acético 0,1N. A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de maior absorção, que foi no comprimento de onda de 324 nm. Em todos os ensaios foram investigados cinco níveis de concentração e em triplicata. O ensaio de repetibilidade foi realizado no mesmo dia e nas mesmas condições de análise, enquanto a precisão intercorrídas foi realizada em intervalos de 6 dias e com analistas diferentes, ambas valendo-se da mesma metodologia.

A precisão é expressa como coeficiente de variação (CV%) (Equação 1), em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. O valor máximo aceitável não pode ultrapassar 5% (BRASIL, 2003).

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100. \quad (1)$$

### 5.2. 1.5 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi feita pela adição e recuperação de padrão, em triplicata, entre cinco níveis de concentração, utilizando-se o método do placebo contaminado, em que a quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma matriz contendo os componentes do medicamento (BRASIL, 2003). Para tanto a solução estoque, bem como a preparação das amostras foi feita como descrito no item precisão, obtendo-se cinco concentrações de 5 a 35  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 2, para determinação da quantidade de fármaco recuperada.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental de BNZ}}{\text{Concentração teórica de BNZ}} \times 100 \quad (2)$$

### 5.2.1.6 Robustez

Para verificar a robustez do método, foram avaliadas as variações na curva padrão à medida que alterava o pH das soluções analíticas. Como a solução intermediária de BNZ ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) possui um pH próximo a 6,50, neste estudo foram preparadas duas soluções estoques de BNZ ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), contendo solução tampão fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 N, pH 4,5), e o pH de cada solução foi ajustado com solução aquosa de NaOH 1 N a fim de obter os valores de 5,5 e 7,5. Neste ensaio foi investigadas as mesmas concentrações de BNZ (5; 10; 20; 30; e,  $35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $n = 3$ ) descritas nos itens Precisão e Exatidão.

### 5.2.1.7 Análise estatística da validação

Os resultados obtidos nos ensaios de precisão intra e inter-corridas foram submetidos ao teste *t* de *Student* para avaliar possíveis diferenças estatísticas. Os resultados obtidos nos estudos de linearidade, exatidão e robustez foram submetidos à análise de variância (ANOVA *oneway*).

## **5.3 Preparação das nanopartículas**

A preparação das nanopartículas (NPs) foi feita pela técnica de emulsificação evaporação-solvente. Inicialmente, um volume apropriado de uma solução de EUD em DCM foi injetado (usando uma bureta), a uma vazão volumétrica de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , em um certo volume de solução aquosa de PVA, sob agitação magnética (640 rpm), a uma temperatura de  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Adicionalmente, essas soluções de polímero e tensoativo foram previamente filtradas em membranas filtrantes de acetato de celulose e a razão volumétrica entre as fases orgânica e aquosa foi mantida constante em um valor de 30:70. Em seguida, essa dispersão recém-preparada foi exposta a um dispersor rotor-estator (Ultra-Turrax), operando a uma velocidade específica, durante 18 minutos, e, após este período, colocada sob agitação magnética (640 rpm), por 24 horas, a uma temperatura de  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , para a remoção de todo solvente orgânico.

Inicialmente, as variáveis analisadas na obtenção das nanopartículas foram as seguintes:

- Velocidade de dispersão: Esta velocidade variou de 3500 a 20000 rpm, sendo as concentrações finais de EUD e PVA fixadas em  $2,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente;
- Concentração final de EUD: Esta concentração variou de  $1,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $4,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo a velocidade de dispersão mantida em 20000 rpm e a concentração de PVA fixada em  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;
- Concentração final de PVA: Esta concentração variou de  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $15,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo a velocidade de dispersão mantida em 20000 rpm e a concentração de EUD fixada em  $1,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Também foi avaliada a influência das diferentes razões volumétricas (75:25; 50:50; 25:75) das misturas de DCM e outros solventes orgânicos (EtOH ou ACE). Nesta avaliação, a velocidade de dispersão utilizada foi de 20000 rpm e as concentrações finais de EUD e PVA foram fixadas em  $1,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

Finalmente, foi avaliada a técnica de injeção da fase orgânica na fase aquosa. Neste caso, foi utilizado uma seringa, bomba peristáltica ou bureta, sendo fixada a velocidade de dispersão em 20000 rpm, as concentrações finais de EUD e PVA foram mantidas em 1,1 mg·mL<sup>-1</sup> e 2,5 mg·mL<sup>-1</sup>, respectivamente, e como solvente orgânico, a mistura de DCM:EtOH na razão volumétrica 50:50.

### *5.3.1 Funcionalização das superfícies das nanopartículas*

As nanopartículas otimizadas, já contendo o fármaco, foram funcionalizadas com ácido siálico e colesterol. Estes foram inseridos separadamente, na fase orgânica polimérica seguindo o mesmo procedimento de avaliação que as nanopartículas não funcionalizadas.

### *5.3.2 Preparação das nanopartículas sólidas*

Alíquotas das dispersões otimizadas (sem fármaco, com fármaco e funcionalizadas) foram centrifugadas por 5min em centrífuga Eppendorf a 16.9 RCF (g), e posteriormente concentradas a fim de remover a água usando um concentrador de vácuo (Labconco Centrivap) durante 7 horas, resultando numa forma sólida para utilização posterior na análise FITR-ATR.

## **5.4 Caracterização das nanopartículas**

### *5.4.1 Medidas de Potencial Zeta ( $\zeta$ ), tamanho de partícula e índice de polidispersabilidade (IPD)*

O tamanho das partículas, índice de polidispersibilidade e potencial zeta dos diferentes sistemas nanoparticulados foram determinados usando dispersão dinâmica de luz (DLS) num modelo de analisador NanoBrook 90Plus (*Brookhaven Instruments Corp.*) do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), do departamento de Bioquímica/UFRN. Todas as medições foram realizadas a uma temperatura constante de 25 °C e um comprimento de onda do feixe de luz de 659 nm, com um ângulo de incidência de 90°. As amostras foram previamente diluídas na proporção de 1:100 ou 1:50 em água purificada, a fim de evitar a agregação de partículas e corrigir a viscosidade da suspensão uma vez que este parâmetro tem influência no cálculo efetuado pelo analisador. O tamanho das partículas e potencial zeta foram expressos como média em nanômetros (nm) e em milivolts (mV), respectivamente, e foram

obtidos a partir da medição de, pelo menos, dez determinações de amostras. As medições foram realizadas em triplicata.

#### *5.4.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) -ATR*

Os espectros na região da absorção do infravermelho dos compostos puros (EUD, PVA, BNZ, COL e AS), das misturas física dos constituintes dos sistemas particulados (EUD e BNZ; EUD e COL; EUD e AS; EUD, BNZ e COL; e, EUD, BNZ e AS) 1:4 (razão BNZ:EUD) e das nanopartículas (NPs; NPs contendo BNZ; NPs contendo BNZ e COL; e, NPs contendo BNZ e AS) foram obtidos a partir de um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo IRPrestige-21 (Shimadzu, Tóquio, Japão) através da técnica de reflectância total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 700 a 5000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e baseados em 20 varreduras. Os sistemas particulados, na forma de pó, foram obtidos a partir da separação de suas dispersões via centrifugação por 5 min em centrífuga (modelo 5418R, Eppendorf) a 16,9 rcf e, posteriormente, concentradas, a fim de remover a água, usando um concentrador centrífugo a vácuo (CentriVap, LabConco) durante 7 horas, até a obtenção de massa constante. Essas dispersões caracterizavam por serem preparadas de acordo com o item 5.3.

#### *5.4.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)*

A forma e tamanho das nanopartículas foram observados usando imagens AFM. Todas as dispersões foram diluídas com água purificada na razão de 1:25. Uma gota de cada amostra foi colocada em lamínulas e estas colocadas em um dessecador a  $(25 \pm 2)$  °C por 24 horas. As imagens topográficas foram obtidas a partir de um microscópio de força atômica (AFM) (SPM-9700, Shimadzu, Quioto, Japão) em modo não-contato, numa frequência de 1 Hz, sob condições ambientais.

#### *5.4.4 Estudo de estabilidade*

O estudo de estabilidade foi realizado com as nanopartículas contendo BNZ não funcionalizadas e funcionalizadas com COL ou AS que, durante 6 semanas, avaliando o

tamanho e potencial zeta. Durante esse período as amostras foram mantidas em freezer a 5 °C e antes de cada análise esperou-se atingir a temperatura ambiente (25 °C).

#### 5. 4. 5 Eficiência de Encapsulação (EE%)

Para a determinação da eficiência de encapsulação, as nanopartículas com BNZ foram preparadas da seguinte maneira o mesmo procedimento que nas nanopartículas sem fármaco. Diferentes proporções fármaco/polímero (1:20; 1:10; 1:5; e, 1:2,5) foram utilizadas, a fim de obter uma carga de fármaco eficiente, que correspondem à concentração de fármaco de 5 %, 10 %, 20 % e 40 % (m/m), respectivamente. As dispersões foram previamente centrifugadas a 16,9 RCF (g) (Eppendorf 5418R microcentrífuga) durante 60 minutos, tempo suficiente para separar os componentes de dispersão. O sobrenadante foi retirado e diluído em água purificada em razão de 1:25 e, em seguida, a leitura foi feita medições em espectrofotometria UV-Thermo Fisher Scientific, Evolução 60S em 324nm. As nanopartículas com maior eficiência de encapsulação terão a superfície funcionalizadas com ácido siálico e colesterol e terão a eficiência calculadas usando os mesmos procedimentos que para as nanopartículas não funcionalizadas. A medição foi realizada em triplicata. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada usando a equação 3:

$$EE = \frac{\text{Massa de BNZ nas nanopartículas}}{\text{Massa de BNZ adicionada}} \times 100. \quad (3)$$

#### 5. 4. 6 Estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação do BNZ pelas nanopartículas (não funcionalizadas e funcionalizadas com COL ou AS) foi realizado utilizando as células de difusão de Franz estáticas verticais (Crown Scientific, Sommerville, EUA). O compartimento receptor destes sistemas foi preenchido com 11 mL de solução tampão de dihidrogenofosfato de potássio (pH 7,4) e mantido a uma temperatura de  $37 \pm 0,5$  ° C, sob agitação constante de 300 rpm. Uma membrana de acetato de celulose com diâmetro de poros de 0,45 µm foi disposta entre o compartimento receptor e doador. Acima desta membrana, no compartimento doador, foi colocado 3 mL do sistema em estudo. Alíquotas de 2 mL foram retiradas através do braço lateral do compartimento receptor em intervalos apropriados de tempo (30, 60, 120, 180, 240, 300,

360, 420 e 480 min) e a concentração de BNZ foi determinada usando um espectrofotômetro UV-Visível Evolution 60S (Thermo Fisher Scientific, EUA), em um comprimento de onda de 324 nm, a partir de uma curva de calibração da solução de BNZ previamente construída. O meio foi reabastecido a cada retirada com 2 mL da solução tampão a fim de manter as condições *in vitro*. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 5.4.7 Estudo de Viabilidade celular

Os estudos foram realizados em linhagem de células Vero E6 (células epiteliais a partir de rim de macacos verdes africanos), onde foram semeadas em placas de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /cavidade), contendo  $2 \times 10^5$  células, sob as quais foram colocados os 4 sistemas testados (nanopartículas sem BNZ, nanopartículas com BNZ e nanopartículas com BNZ funcionalizadas com COL ou AS). Diluições seriadas dos sistemas foram realizadas com soro bovino fetal (SFB) a 2 %. Posteriormente, os compostos em diferentes concentrações (100; 50; 25; 10 e 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram adicionados e incubados por 24 horas à 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Como controle positivo foi usado o meio L15 2 % e como controle negativo, o DMSO.

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazolium]. O ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo] a cristais de formazan, de cor púrpura. Após 4 horas, com os cristais já solubilizados, a quantificação foi realizada em leitor de ELISA em 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata e em seguida normalizados conforme a Equação 4 apresentada abaixo.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância das células das amostras}}{\text{Absorbância das células controle positivo}} \times 100. \quad (4)$$

### 5.5 Análise estatística

Os resultados experimentais para análise quantitativa do fármaco foram submetidos à análise de variância (ANOVA *one-way*), para múltiplas comparações. Quando os valores de F revelaram-se significativos, os dados ainda foram analisados pelo teste *post-hoc* *Tukey*, para comparação entre conjuntos de amostras diferentes, ou pelo teste *post-hoc* *Dunnnett*,

para comparações com um conjunto de amostras controle. Para comparação de dois conjuntos de amostras foi realizado o teste *t Student*. Um  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Validação do método espectrofotométrico UV-Vis

O desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas para análise quantitativa de fármacos constituem uma etapa fundamental para assegurar os resultados experimentais de estudos de estabilidade ou solubilidade (AQUINO et al., 2001). Vários métodos analíticos têm sido propostos para a determinação do BNZ, incluindo análise eletroquímica, espectrofotometria UV-Vis e HPLC (SILVA et al., 2007; STRECK et al., 2011). Para tanto, o presente estudo valeu-se da espectrofotometria UV-Vis e investigou as eventuais interferências dos componentes da formulação, além da influência do analista e do intervalo de dias, os quais podem ser determinantes para a quantificação do BNZ. Sendo assim, a validação se torna indispensável, por garantir um método simples, rápido, preciso, específico e exato para a análise quantitativa do fármaco em diferentes complexos multicomponentes estudados.

As soluções analíticas foram submetidas à varredura na faixa de 200 a 400 nm para escolha do comprimento de onda específico para o BNZ, no qual não houvesse interferência dos componentes investigados. O comprimento de onda encontrado foi de 324 nm o qual foi utilizado para o doseamento do fármaco durante todo o estudo.

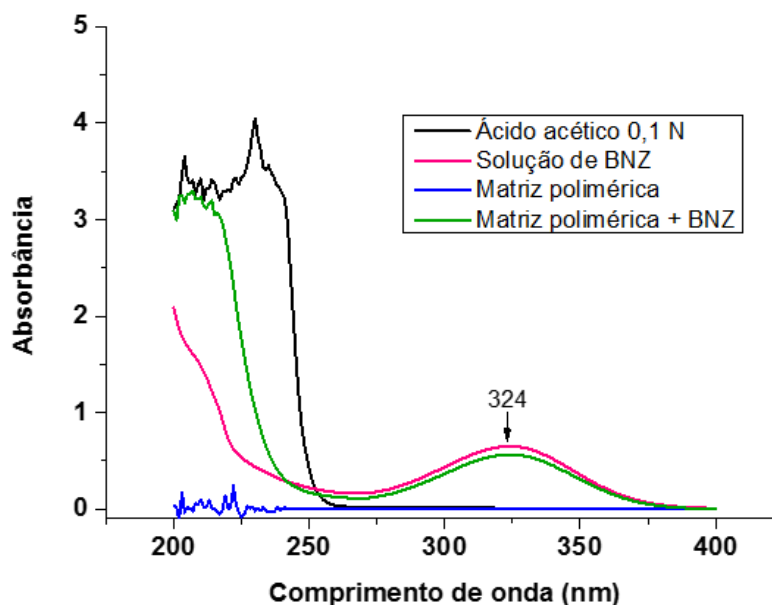
#### 6.1.1 Especificidade e seletividade

O ensaio de especificidade e seletividade descreve a capacidade do método identificar e mensurar a quantidade fármaco na presença de impurezas, excipientes ou produtos de degradação (ICH, 2005).

A fim de verificar a especificidade e seletividade do método, foram obtidos espectros de varredura em Solução de matriz contendo Eudragit sem o fármaco; solução de BZN em ácido acético ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); em solução de matriz contendo Eudragit com BNZ; apenas o solvente (ácido acético 0,1N).

Pela Figura 3 é possível observar que a curva que representa somente o solvente e as com os componentes da matriz polimérica sem fármaco, tiveram pouca ou nenhuma

absorbância no comprimento de onda de 324 nm. Os únicos espectros que tiveram máxima absorbância nesse comprimento de onda foram das amostras que continham o fármaco, sendo um indicativo de que os componentes da matriz não interferem na absorção do BNZ, comprovando a eficiência do método quanto a este ensaio.



**Figura 3**-Perfis de absorbância no UV-Vis: (azul) Solução de matriz contendo EUD sem o fármaco; (rosa) solução BZN ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); (verde) solução de matriz polimérica contendo BNZ; (preta) solvente (ácido acético).

### 6.1.2 Curva analítica

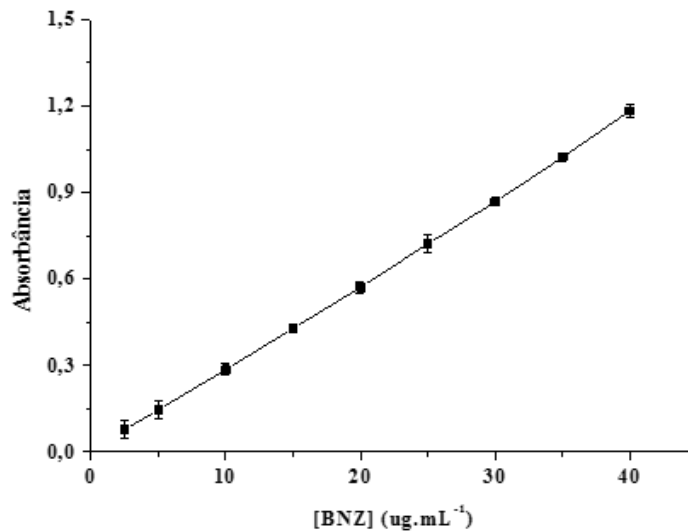
Garantida a especificidade do método, obteve-se a curva analítica ou curva de calibração, a qual representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (BRASIL, 2003; ICH, 2005)

Para o BNZ, a curva foi obtida a partir dos valores de analisadas em comprimento de onda específico (324nm), de nove concentrações variando de  $2,5$  a  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , como está exposta na figura 4.

A equação de regressão linear definida a partir da curva analítica foi  $y = 0.02933 x - 0.00479$ . Tal equação possibilita obter, através dos valores de absorbância, a concentração de BNZ em cada amostra analisada ( $y$  = absorbância e  $x$  = concentração do fármaco).

Segundo o ICH (2005), um método é considerado linear quando o coeficiente de correlação for maior ou igual a 0,99. Após determinação da curva analítica, o coeficiente de

correlação obtido foi de 0,9994, o que indica a linearidade do método para a análise quantitativa do BNZ.



**Figura 4**-Curva analítica do benznidazol.

A linearidade demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do BNZ na amostra, dentro de um intervalo especificado (2,5 a 40 µg·mL<sup>-1</sup>). Todas as análises realizadas durante o estudo estiveram dentro desse intervalo de concentração, sendo consideradas as amostras diluídas.

Os dados utilizados para construir a curva analítica foram submetidos à análise de variância (ANOVA *oneway*), os quais mostraram regressão linear sem desvio de linearidade significativo [F(1,7) = 9,5; (p > 0,05)]. Estes valores estão em conformidade com as diretrizes estabelecidas (ICH, 2005).

### 6.1.3 Precisão

Os resultados obtidos no estudo de precisão intra e intercorridas demonstraram a precisão do método. Em ambos os ensaios foram observados valores de coeficiente de variação (CV < 5%), indicado que as mudanças inseridas no teste não foram capazes de causar alterações. Os resultados obtidos para cada concentração investigada nos dois ensaios foram ainda submetidos ao teste *t* de *Student* para avaliar uma possível diferença estatística. Como demonstrado na tabela 1, não houve diferença estatística (p < 0,05) entre os valores determinados no ensaio intracorrida e o intercorrida, o que confirma a análise da precisão do método para os diferentes ensaios.

#### 6.1.4 Exatidão

A exatidão do método pode ser expressa como a porcentagem da recuperação de uma quantidade conhecida de fármaco adicionado à amostra, descrevendo o grau de veracidade dos resultados obtidos da análise quantitativa. Esta amostra pode ser a forma farmacêutica ou somente o placebo (mistura de excipientes). Para o presente estudo foram investigados cinco níveis de concentração (5,0; 10,0; 20,0; 30,0; e 35,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em triplicata, utilizando o ensaio do placebo contaminado. O limite estabelecido do nível de recuperação aceitável para produtos farmacêuticos no Brasil está entre 80 - 120% (BRASIL, 2003). O ensaio de exatidão realizado para as diferentes concentrações investigadas demonstrou a exatidão do método para a análise quantitativa do BNZ (Tabela 1).

O nível de recuperação variou de 91,8% a 100,0%, sendo que os dados experimentais do ensaio de recuperação foram submetidos à análise de variância (ANOVA *oneway*) e não foi observada diferença estatística significativa [ $F(1,9) = 0,0048$ ;  $p = 0,946$ ] entre os valores de recuperação obtidos ( $n = 3$ ) para os cinco níveis de concentração investigados (5,0-35,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Estes resultados demonstram que o método pode ser aplicado com segurança. O sucesso do método quanto à eficiência na recuperação ocorreu possivelmente devido à escolha do sistema solvente para dispersão da amostra.

#### 6.1.5 Robustez

A robustez consiste em um ensaio que permite avaliar a capacidade do método analítico de resistir a possíveis alterações de parâmetros analíticos importantes. Para espectrofotometria, fatores como variação do pH da solução, temperatura e diferentes tipos de solventes, podem ser considerados na determinação deste parâmetro (ICH, 2005). Neste caso, o efeito de intervalos de pH (5,5, 6,5, e 7,5) foi investigado na análise quantitativa do BNZ, através da exatidão e precisão de seus valores (Tabela 1). O método analítico foi considerado robusto frente às variações de pH da solução em estudo. Nenhuma diferença estatística foi observada entre as concentrações experimentais do fármaco para os diferentes valores de pH (5,5 e 7,5) quando comparado com os valores obtidos para a solução de BNZ (pH 6,5). Logo, não foi constatada a susceptibilidade do método a variações desse parâmetro analítico.

Após submeter os dados experimentais obtidos para cada concentração, a análise de variância (ANOVA *oneway*) não apresentou diferença estatística significativa para as concentrações de 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  [ $F(1,4) = 29,78$ ;  $p = 0,05$ ]; 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  [ $F(1,4) = 0,002$ ;  $p = 0,964$ ];

20 mg mL<sup>-1</sup> [F(1,4) = 0,967; p = 0,381] e 30 µg·mL<sup>-1</sup> [F(1,4) = 0,450; p = 0,538]; 35 µg·mL<sup>-1</sup> [F(1,4) = 0,720; p = 0,443]. Quando a concentração da preparação foi 5 µg·mL<sup>-1</sup>, observou-se que esta apresentou-se no limite do valor admitido (p<0,05), o que não ocorreu para as demais concentrações. É interessante ressaltar que a concentração escolhida para a análise quantitativa do fármaco no sistema foi aquela localizada no meio da curva padrão (20 µg·mL<sup>-1</sup>). Os ensaios permitiram concluir que a metodologia pode ser considerada segura e validada garantindo, portanto, a confiabilidade necessária para as análises quantitativa, sendo considerada robusta.

**Tabela 1-** Resultados experimentais do estudo de validação para análise do BNZ através do método espectrofotométrico UV-Vis para precisão, exatidão e robustez.

Parâmetros Analíticos	BNZ (µg mL <sup>-1</sup> ± DP) (DPR*%)				
	5 µg·mL <sup>-1</sup>	10 µg·mL <sup>-1</sup>	20 µg·mL <sup>-1</sup>	30 µg·mL <sup>-1</sup>	35 µg·mL <sup>-1</sup>
<b>Precisão</b>					
<i>Intra-dia</i>	5,3 ± 000,4 (3,1)	10,0 ± 0,002 (0,9)	19,7 ± 0,003 (0,5)	29,7 ± 0,001 (0,13)	35,0 ± 0,003 (0,6)
<i>Inter-dia</i>	5,2 ± 0,002 (1,7)	9,9 ± 0,001 (0,4)	19,8 ± 0,004 (0,75)	29,9 ± 0,01 (1,2)	35,5 ± 0,004 (0,4)
<b>Teste t-Student (p)</b>	0,53	0,42	0,42	0,42	0,42
<b>Exatidão (%)</b>					
	91,8 ± 0,007 (5,1)	97,0 ± 0,013 (4,8)	100,0 ± 0,012 (2,3)	100,0 ± 0,001 (0,14)	100,0 ± 0,03 (2,9)
<b>ANOVA</b> F(0,4) = 0,0048; p= 0,946					
<b>Robustez</b>					
<i>pH 5,5</i>	5,1 ± 0,001 (0,96)	10,2 ± 0,0 (0,0)	19,6 ± 0,01 (1,9)	29,3 ± 0,012 (1,5)	34,2 ± 0,02 (2,4)
<i>pH 6,5</i>	6,3 ± 0,004 (1,2)	9,8 ± 0,008 (0,8)	19,7 ± 0,003 (0,5)	29,7 ± 0,001 (0,13)	35,0 ± 0,003 (0,6)
<i>pH 7,5</i>	5,2 ± 0,001 (0,96)	10,2 ± 0,0 (0,0)	20,1 ± 0,01 (1,9)	29,9 ± 0,012 (1,5)	35,4 ± 0,02 (2,4)
<b>ANOVA</b> F (2,14) = 0,0052; (p= 0,982)					

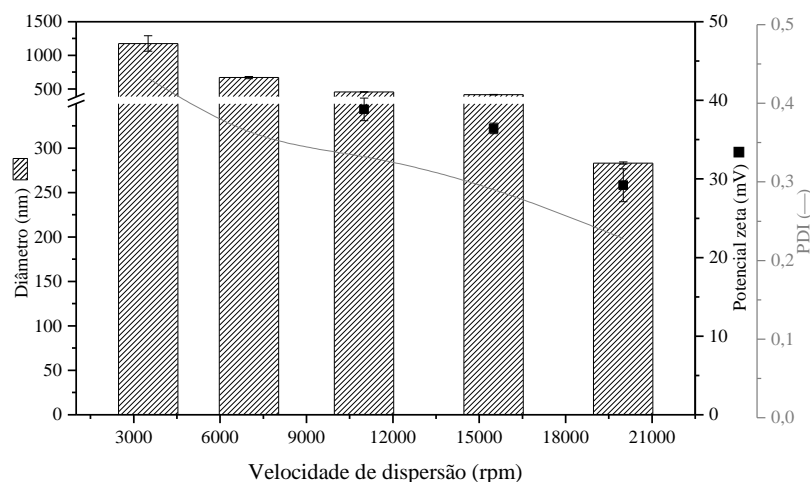
Estatisticamente diferente 100% (p<0,05). CV= coeficiente de variação; DP= desvio padrão.

## 6.2 Caracterização das nanopartículas

### 6.2.1 Efeito da velocidade de dispersão

A influência da velocidade de agitação sobre o diâmetro médio das distribuições de tamanhos de partículas é mostrada na Figura 5. As partículas foram preparadas utilizando fase orgânica de DCM contendo 0,50% m/v de Eudragit na fase orgânica, 0,25% m/v de PVA da fase aquosa, a uma velocidade constante de injeção de amostra de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  à temperatura ambiente.

A estabilidade e o tamanho de gotículas formadas na emulsão depende de parâmetros da formulação e da velocidade de agitação, o que afeta o tamanho das nanopartículas (HAMISHEHKAR et al., 2009). Para toda a velocidade diferente estudada foi possível formar partículas ( $d < 1,300 \text{ nm}$ ), usando o método de emulsificação-evaporação de solvente. Além disso, o aumento da velocidade de homogeneização levou a uma diminuição do diâmetro de  $1176,5 \pm 114,7 \text{ nm}$  para  $283,2 \pm 1,23 \text{ nm}$ , como se pode ver na curva que representa a velocidade de 20.000 rpm, que tem o menor diâmetro médio ( $d \approx 280 \text{ nm}$ ), valor PDI ( $0,205 \pm 0,04$ ) e uma distribuição de tamanho de partícula unimodal. A largura da distribuição de tamanho de partícula foi fortemente afetada pela velocidade de agitação com PDI sendo  $0,290 \pm 0,04$ ,  $0,332 \pm 0,01$ ,  $0,364 \pm 0,02$  e  $0,432 \pm 0,04$  para o 15000, 11000, 7000 e 3500 rpm, respectivamente.



**Figura 5-** Efeito da velocidade de dispersão na distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta.

A redução da dimensão das partículas com o aumento da velocidade de agitação pode ter sido devido à elevada energia mecânica aplicada, conduzindo a uma dispersão rápida e

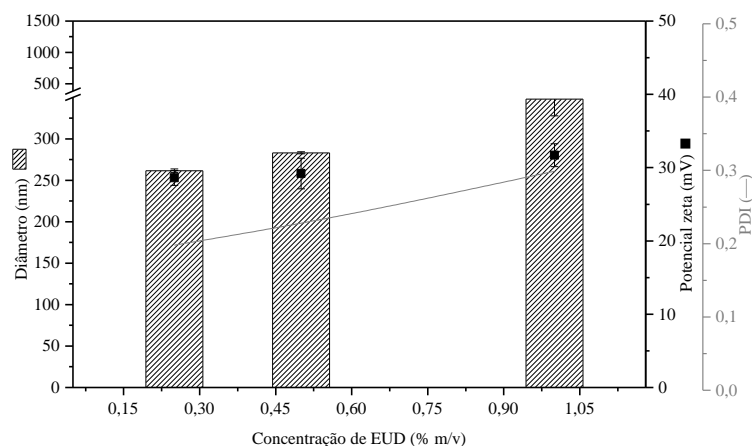
eficiente e pareceu melhorar a transferência de massa e velocidade de difusão entre as fases. Isto induziu a uma alta homogeneização do processo e rápida nucleação para produzir partículas menores (JAVADZADEH et al., 2010; MEHROTRA; NAGARWAL; PANDIT, 2011). Portanto, a fim de preparar NPs de menores distribuições de tamanho, a velocidade de agitação otimizada foi de 20.000 rpm.

### 6.2.2 Efeito da concentração do polímero

Outro parâmetro importante para as características de tamanho e superfície das nanopartículas catiônicas é a concentração de polímero. Para este parâmetro foi utilizado nanopartículas com uma concentração fixa de PVA (0,25%) a uma velocidade de agitação de 20.000 rpm. Este efeito é mostrado na Figura 6.

O aumento da concentração de copolímero na fase orgânica na gama de 0,25 a 1% (m/v) contribuiu para um ligeiro aumento do tamanho de partícula (261,5 nm - 348,0 nm). Isto ocorreu provavelmente devido não somente ao aumento de concentração do soluto nas gotículas de solventes orgânicos, mas também ao aumento da viscosidade da fase dispersa (solução de polímero no solvente orgânico), resultando na formação de gotículas maiores.

Além disso, a associação de polímero de cadeia conduz a uma resistência de transferência de massa, diminuindo difusão solvente resultando em nanopartículas maiores (DE OLIVEIRA et al., 2013; JANA et al., 2014). Esta dependência direta do tamanho NP com a concentração do polímero também foi observado por outros autores para Eudragit, PLA, quitosano e PLGA (CHORNY et al., 2002; KWON et al., 2001).



**Figura 6-** Efeito da concentração de copolímero no tamanho da partícula e no potencial zeta

O potencial  $\zeta$  positivo (cerca de +29 mV) é atribuído à carga positiva de Eudragit, tendo em conta que é um polieletrólito catiônico, a carga superficial esperada é positiva, devido à presença de grupos amino protonados. Não houve diferença significativa no potencial  $\zeta$  entre diferentes concentrações de polímero ( $p < 0,05$ ), mas um ligeiro aumento é sugerido, devido à maior quantidade de polímero (JANA et al., 2014).

Neste passo, a concentração de 0,25% (m/v) de polímero foi fixada, a fim usar uma quantidade razoável de polímero, uma vez que esta concentração mostrou-se satisfatória na produção de partículas de tamanhos menores. A polidispersidade da dispersão também foi menor que nas demais concentrações, apresentando um valor médio de  $0,198 \pm 0,016$ .

### 6.2.3 Efeito da concentração do tensoativo

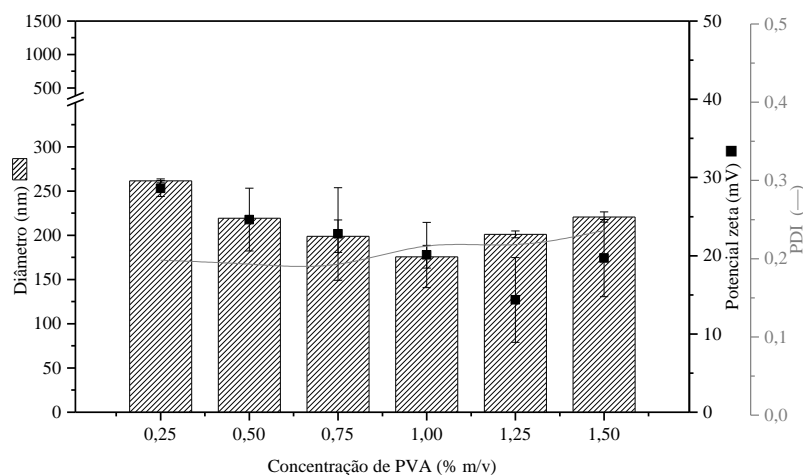
O efeito da concentração de tensoativo no tamanho de partícula, PDI e potencial  $\zeta$  foram investigadas através da preparação de uma série de amostras com uma concentração fixa de EUD (0,25%) e do tipo de surfactante (PVA) com velocidade de agitação de 20.000 rpm.

O tipo de surfactante não-iônico usado teve um impacto significativo no diâmetro, PDI e distribuição de tamanho de partícula dos sistemas formados (Figura 7). As menores NPs com a distribuição mais estreita foram formadas nos sistemas preparados utilizando 1,0% de PVA com diâmetro  $175,8 \pm 12,9$  e PDI  $0,216 \pm 0,01$ , enquanto que as maiores NPs com a distribuição mais ampla foram formadas nos sistemas preparados utilizando 0,25% de PVA, apresentando um diâmetro de  $261,5 \pm 2,23$  e PDI  $0,198 \pm 0,02$ .

Como observado, o diâmetro inicialmente decresceu com o aumento da concentração de tensoativo (0,25 a 1%), o que está de acordo com outros estudos (ANTON; VANDAMME, 2009). Esta observação tem sido atribuída a vários fenômenos físico-químicos dependendo do mecanismo que foi proposto para formar as nanopartículas. Em primeiro lugar, tem sido atribuída a um aumento da adsorção de moléculas de surfactante fases orgânica / interface aquosa que conduzem a uma diminuição da tensão interfacial, o que provoca a formação de partículas menores. Em segundo lugar, tem sido atribuída a uma maior quantidade de moléculas de surfactante difundindo a partir da fase orgânica para a fase aquosa, conduzindo assim à formação de menor diâmetro NP (LAMAALLAM et al., 2005).

Quando a concentração de surfactante foi aumentada ainda mais (1-1,50%) observou-se um aumento no diâmetro médio das partículas, o que também foi relatado em outros estudos (ANTON; VANDAMME, 2009; NG et al., 2010). Postulou-se que o tamanho das gotículas

aumentam acima de uma determinada concentração de surfactante devido à formação de uma fase líquida altamente viscosa, que faz separação espontânea entre as fases (WANG et al., 2009). Além disso, Lebouille et al (2013) atribui este comportamento da superfície das nanopartículas poliméricas que são bastante “lisas” e pode facilmente fundir e formar partículas mais grosseiras. O índice de polidispersidade segue a mesma tendência que o diâmetro das partículas, com PDI diminuindo até uma concentração de 1%, e aumentando após 1,50%. A 1% concentração de PVA  $\zeta$  potencial valor foi de cerca de +20 mV, tendo em conta a relativa estabilidade sistema.

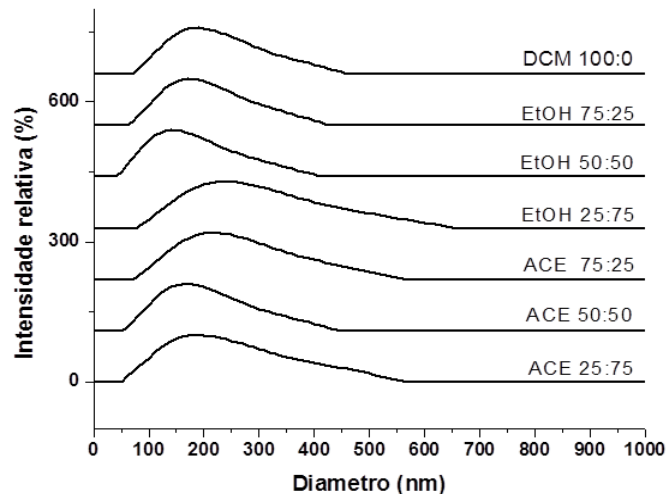


**Figura 7-** Efeito da concentração do tensoativo sob o tamanho e potencial  $\zeta$  das nanopartículas

#### 6.2.4 Influência do tipo de solvente

O efeito do tipo e proporção do solvente sobre a formação de pequenas partículas pelo método de emulsificação- evaporação solvente foi investigada através da preparação de NP com concentração fixa de Eudragit (0,25%) e concentração de PVA fixa (1%) a uma velocidade de agitação de 20.000 rpm.

Pode ser observado na Figura 8 que diâmetro médio de partícula e PDI de NPs formadas foram afetadas pelos diferentes solventes. Dois solventes miscíveis em água, como etanol (cerca de 24,6 constante dielétrica) e acetona (cerca de constante dielétrica 20,6) em diferentes proporções (75:25; 50:50 e 25:75) foram misturadas com diclorometano (cerca de constante dielétrica de 9,1). O tamanho das partículas diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) quando utilizado nesta combinação de solventes, a 50:50 em comparação com DCM puro.



**Figura 8** - Efeito do tipo de solvente orgânico

Solventes de elevada polaridade como acetona e etanol são relatados para formar nanopartículas de pequeno tamanho (LEGRAND et al., 2007; NG et al., 2010; THIOUNE et al., 1997), promovendo a difusão rápida para a fase aquosa (GUHAGARKAR; MALSHE; DEVARAJAN, 2009; MU; FENG, 2002). Isso justifica o menor tamanho de partícula ser obtido com DCM: EtOH na proporção 50:50, com diâmetro de  $143,5 \pm 4,03$  e PDI  $0,260 \pm 0,02$ .

Mainardes et al (2005) em estudo de otimização de nanopartículas de PLGA contendo praziquantel, utilizando o PVA como tensioativo e mesmo solvente não polar (DCM), pela técnica de emulsificação-*evaporação* solvente, obteve tamanho de partículas em torno de 248 nm. Isto prova a importância de associação de solventes mais polares com DCM para reduzir o tamanho de partícula.

Os maiores valores de potencial  $\zeta$  também foram obtidos na proporção de 50:50 misturas, sendo mais pronunciada na mistura DCM: EtOH, indicando uma maior estabilidade no presente sistema e que a carga de superfície das partículas na formulação exercem uma significativa correlação com o tipo e proporção de solventes utilizados (SCHAFFAZICK et al., 2003).

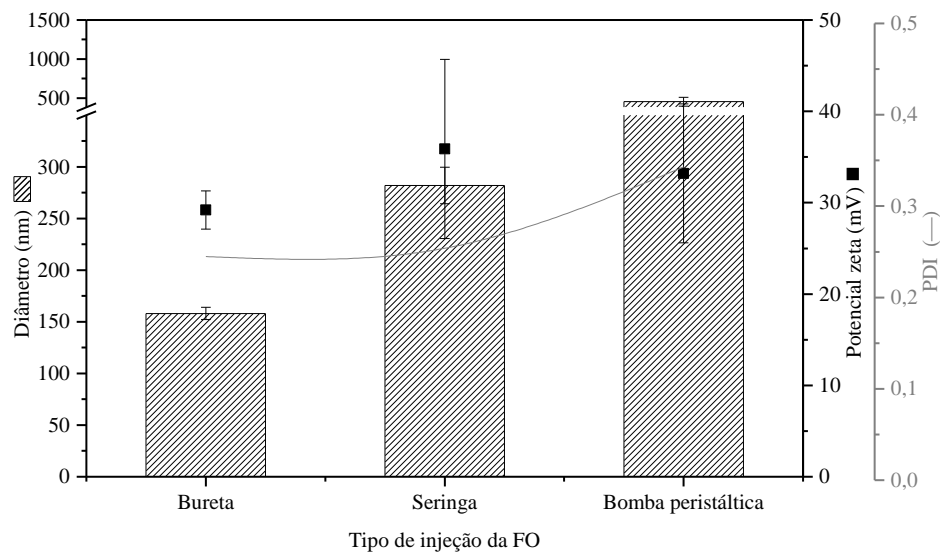
#### 6.2.5 Efeito do tipo de injeção de amostra

Após a padronização da obtenção das nanopartículas, viu-se a necessidade de confirmar se de fato a bureta fora a melhor forma de injeção de fase orgânica. Para isso, as nanopartículas foram preparadas usando a bomba peristáltica e a seringa (método da gravidade) todos sem fármaco, usando NPs com concentração fixa Eudragit (0,25%) e concentração fixa de PVA

(1%) em velocidade de agitação de 20.000 rpm e razão de mistura de solventes 50:50 de DCM: EtOH. Para todas as formas de injeção de amostra foi fixada a velocidade de 1 mL.min<sup>-1</sup>, todos com a agulha imersa.

Os resultados demonstraram que, ao utilizar a bureta (diâmetro  $158,1 \pm 5,9$  e PDI  $0,245 \pm 0,03$ ) e a seringa ( $282,03 \pm 17,7$  e PDI  $0,254 \pm 0,03$ ) tanto resultou num menor tamanho de partícula quanto numa menor polidispersão do que os formados em sistemas preparados utilizando a bomba peristáltica (diâmetro  $453,3 \pm 57,3$  PDI e  $0,343 \pm 0,04$ ) (Figura 9). Esta diferença pode ser explicada pelas características de fluxo, uma vez que este relaciona área com o tempo de escoamento (CARVALHO, 2008). À medida que a bureta tem uma trajetória regular, e ainda possui uma maior altura da coluna (maior influência da gravidade), sugere-se que não haja muita a turbulência como uma bomba peristáltica, o que pode justificar a tamanhos de partículas menores (FELICES, 2007).

Portanto, para esta formulação, a bureta foi realmente a melhor forma de injeção de amostra.

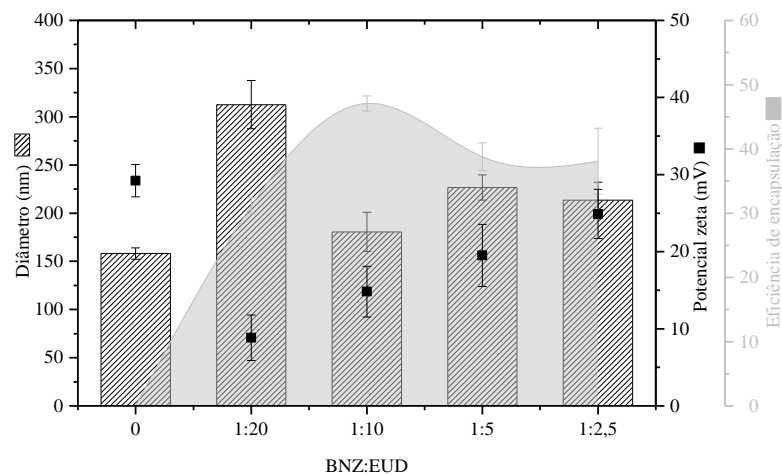


**Figura 9-** Efeito do tipo de injeção de fase orgânica em fase aquosa

### 6.2.6 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de carga de fármaco foi investigada por diferentes razões fármaco: copolímero. O BNZ foi encapsulado com êxito nas nanopartículas catiônicas, mesmo para as amostras com a porcentagem de fármaco mais elevada. A melhor eficiência de encapsulação para o BNZ (47,08%) foi observada para a razão fármaco: copolímero de 1:10, que corresponde

a cerca de 10% da carga de fármaco. A maior quantidade de BNZ contribuiu para aumentar o tamanho das partículas, em comparação com nanopartículas carregadas com menor percentual de fármaco, como mostrado na Figura 10. Isto pode ser explicado pelo fato de que uma maior quantidade de fármaco resulta numa fase dispersa mais viscosa, tornando difícil a dispersão mútua das fases e originando partículas maiores.



**Figura 10-** Eficiência de encapsulação para as nanopartículas em diferentes razões fármaco:copolímero

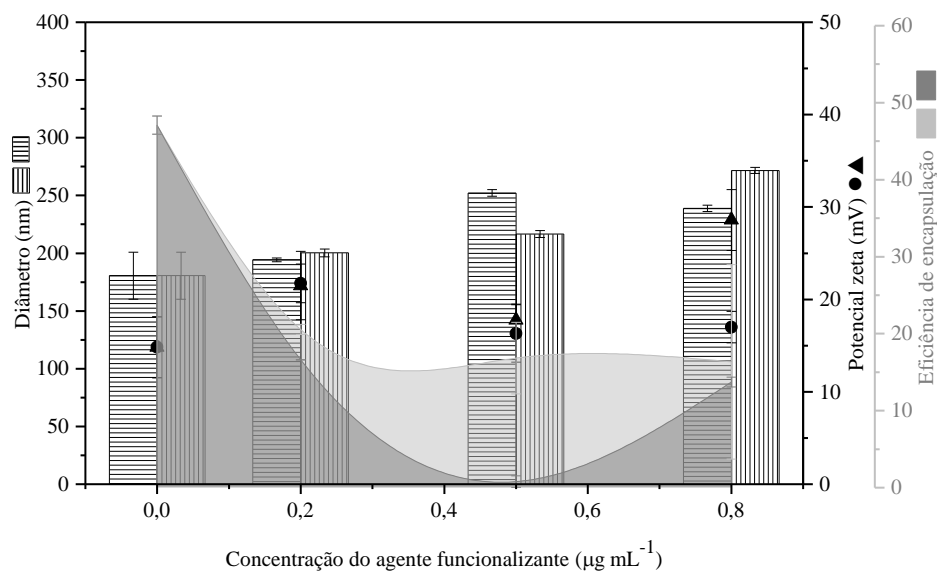
Em Zhang et al. (2013) mostra a eficiência de carga de fármaco em nanopartículas contendo ibuprofeno (que é um fármaco não-polar, como BNZ) entre 44,7% e 52,2% para uma percentagem de fármaco de 5,5 e 12%, respectivamente. Isto mostra que, para um valor de 10% foi obtida uma boa eficiência de encapsulação do fármaco. A redução do tamanho de partícula é positiva porque leva ao aumento da área de superfície, o que pode levar a uma melhor eficiência de encapsulação (MOBARAK; SALAH; ELKHESHEN, 2014; ZHANG et al., 2013). Além disso, a mudança do tamanho das partículas é um indicativo de que realmente houve uma interação entre o fármaco e copolímero. O teor de fármaco em nanopartículas é influenciado pela afinidade fármaco-polímero e pela miscibilidade, com isso se esperava uma resposta positiva para a hidrofobicidade do polímero e do benznidazol (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007).

No que diz respeito ao potencial zeta, observa-se que aumenta com o aumento da quantidade de fármaco ( $+14.8 \pm 2.9\text{mV}$  a  $+24.9 \pm 3.2\text{mV}$ ). Isto pode sugerir que quando existe uma interação fármaco:copolímero mais elevada, os grupos amino protonados do polímero

ficam menos expostos, de modo que um potencial  $\zeta$  mais baixo é evidenciado na razão que há uma maior eficiência de encapsulação.

### 6.2.7 Funcionalização da superfície das partículas e eficiência de encapsulação

A fim de modificar a superfície das partículas para melhorar o direcionamento ao órgão-alvo, foram adicionados ao sistema ácido siálico e colesterol, ambos separadamente constituindo sistemas distintos. A princípio, de cada sistema, variou-se a concentração do ácido e do colesterol em relação à fase orgânica polimérica, de 0,2; 0,5 e 0,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O resultado pode ser observado na figura 11.



**Figura 11-** Efeito dos agentes funcionalizantes sob o diâmetro de partícula (colesterol-área tracejada vertical e ácido siálico-área tracejada horizontal) e potencial zeta (●, ▲), respectivamente e eficiência de encapsulação do Ácido siálico (■) e do Colesterol (●).

A eficiência de encapsulação também foi calculada para esses sistemas, ambos contendo 10% de BNZ, que foi o melhor valor obtido na EE% da nanopartícula otimizada. Em concordância com os valores de menor tamanho de partícula, foi expressa uma maior eficiência de encapsulação para os sistemas contendo ácido siálico e colesterol a 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (20,5 EE% e 16,6 EE%, respectivamente).

Isso confirma o menor diâmetro caracterizar uma maior superfície de contato, o que acarreta a uma encapsulação mais eficiente (MOBARAK; SALAH; ELKHESHEN, 2014). Como essas substâncias podem estar competindo pelo substrato do polímero junto ao fármaco,

os valores de eficiência são menores quando comparados com dos sistemas contendo apenas o fármaco (47 EE%).

O aumento de tamanho de partícula em ambos sistemas (~200 nm) é um indicativo de que realmente houve a modificação da superfície das partículas (MOBARAK; SALAH; ELKHESHEN, 2014).

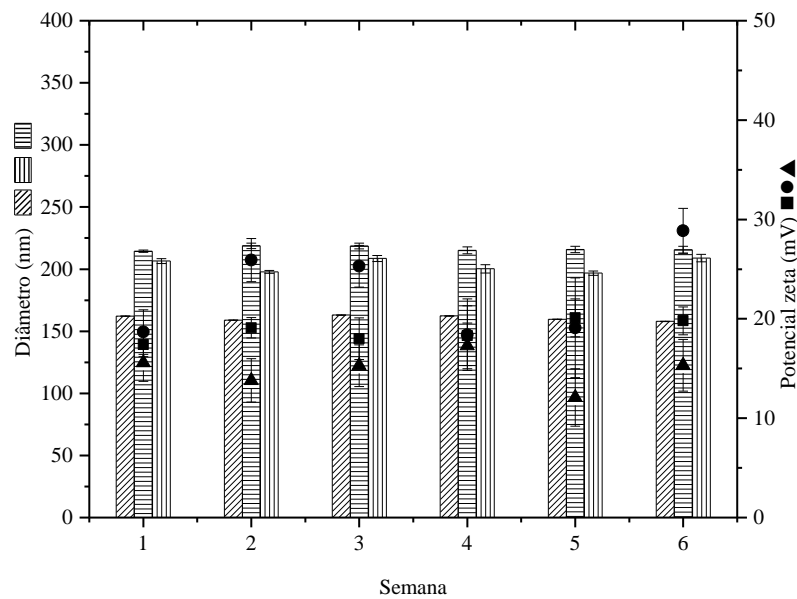
Pode-se observar que para ambos os sistemas a concentração de  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  apresentou valores mais adequados quanto ao tamanho e ao PDI, bem como exibiu maiores valores de potencial  $\zeta$  (em torno de +25mv), sendo indicativo de um sistema que tende a estabilidade.

#### 6.2.8 Estudo de estabilidade

Para comprovar isso, foi realizado um estudo de estabilidade com nanopartículas contendo 10% BNZ (tanto para as nanopartículas não funcionalizadas, quanto para as funcionalizadas com ácido siálico e para as funcionalizadas com colesterol a  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 6 semanas. Os resultados podem ser vistos na Figura 12.

Pode-se observar que, durante o período de avaliação, as nanopartículas não sofreram alterações significativas em seus tamanhos, com desvios entre elas de no máximo 5nm. O potencial zeta também não apresentou mudança significativa em seus valores ( $p>0,05$ ), mantendo-se em valores médios de +25mV. As alterações no tamanho de partícula pode sugerir a presença de fenômenos de instabilidade, tais como floculação, cremagem, sedimentação, coalescência (LEMARCHAND et al., 2003a; TERAYAMA et al., 2003).

As análises por  $\zeta$  potencial também têm sido utilizadas para estudar a estabilidade de vários sistemas coloidais, tais como dispersões, suspensões de nanopartículas e emulsões, sendo capaz de detectar fenômenos de desestabilização devido a alterações na carga de superfície que pode aproximar ou afastar as partículas (COURNARIE et al., 2004; DALE; KIJLSTRA; VINCENT, 2005; LEMARCHAND et al., 2003a, 2003b; NG et al., 2010).



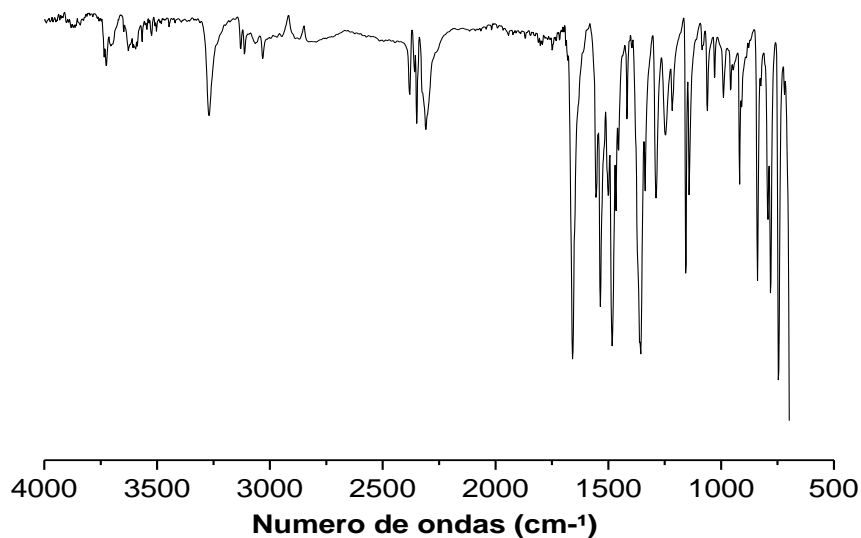
**Figura 12-** Estudo de estabilidade das nanopartículas contendo o BNZ (●,○);nanopartículas contendo o BNZ com colesterol (■,□);nanopartículas contendo o BNZ com o ácido siálico (▲, △). Os símbolos fechados representam o diâmetro e os vazados o potencial zeta.

Como não houve variação significativa de diâmetro e potencial zeta por seis semanas ( $p > 0,05$ ), sugere-se que não houve fenômenos de instabilidade neste período e que o sistema apresenta estabilidade física e química, podendo ter um potencial uso parenteral.

#### 6.2.10 Análise do Infravermelho (FTIR)

A análise do Infravermelho foi realizada para verificar se houve interação entre os componentes da matriz polimérica e o fármaco. A seguir serão discutidos apenas os sinais de maior relevância.

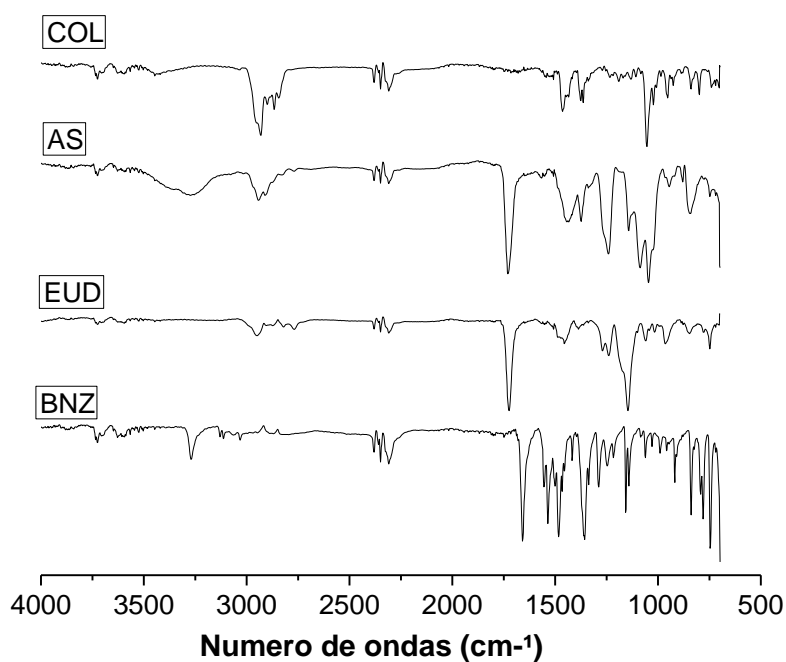
No espectro obtido para o BNZ foi possível identificar os picos referentes às ligações presentes na molécula. A Figura 13 mostra o espectro do BNZ de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 13**– Espectro na região IV do BNZ.

O espectro IV do BNZ apresentou os picos característicos de absorção do fármaco em 3272, 3139 a 3068  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à deformação axial de ligações N-H de amidas secundárias. A deformação angular de N-H foi observada em 1554 e 1536  $\text{cm}^{-1}$ . O estiramento característico da absorção da carbonila presente na amida secundária foi observado em 1660  $\text{cm}^{-1}$ . Os estiramentos da ligação N-O de compostos covalentes, presente no grupo  $\text{NO}_2$ , foram identificados entre 1660 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  e entre 1365 e 1335  $\text{cm}^{-1}$ . Para identificação do grupamento nitro-aromático, um pico intenso em 871  $\text{cm}^{-1}$  foi verificado. As bandas fracas de 1965 a 1808  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de compostos aromáticos, devido à deformação axial das ligações C-H. As bandas de deformação angular no plano e fora do plano das ligações C-H de compostos aromáticos também podem ser visualizadas entre 1246 e 1028  $\text{cm}^{-1}$  e entre 871 e 698  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Vibrações de esqueleto em 1418, 1486, 1500  $\text{cm}^{-1}$  foram verificados, sendo os dois últimos na forma de dubletes, devido à deformação axial das ligações C-C presentes no anel aromático. Os picos em 1335 e 1291  $\text{cm}^{-1}$  referem-se às vibrações de deformação axial das ligações C-N presentes em aminas aromáticas.

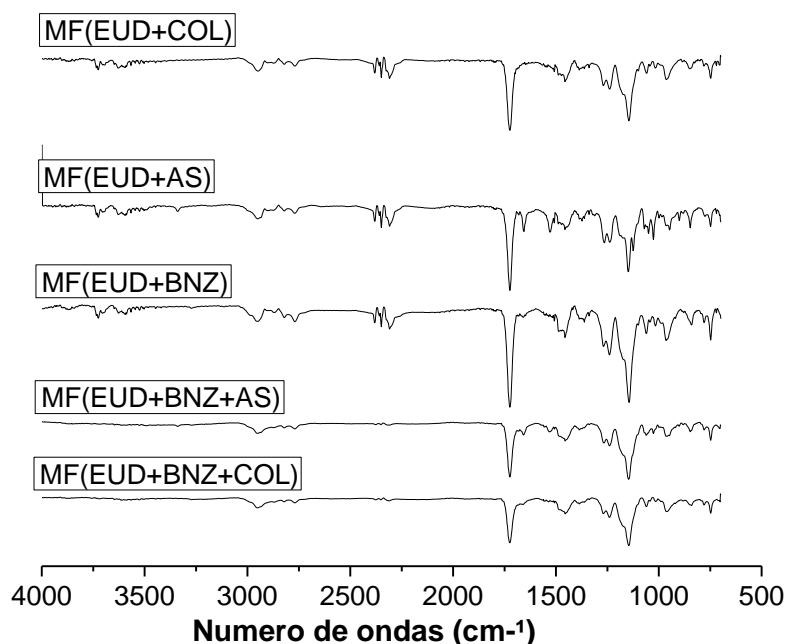
Os espectros dos compostos puros (EUD, COL, AS) podem ser vistos junto ao do BNZ na figura 14.



**Figura 14**-Espetros do IV para os compostos puros

O EUD puro mostrou picos de absorção característicos, com bandas de estiramento significativo NC perto 1,300 centímetro-1 e bandas de C = O alongamento do éster em cerca de 1,730 centímetro-1. O espectro do colesterol puro apresenta uma banda larga entre 3250 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  devida à vibração de alongação da ligação O-H. O espectro do ácido siálico apresentou bandas da carbonila do ácido carboxílico em aproximadamente 1750  $\text{cm}^{-1}$ , carbonila da amida secundária em aproximadamente 1630  $\text{cm}^{-1}$ , e hidroxilas em aproximadamente 3300  $\text{cm}^{-1}$ .

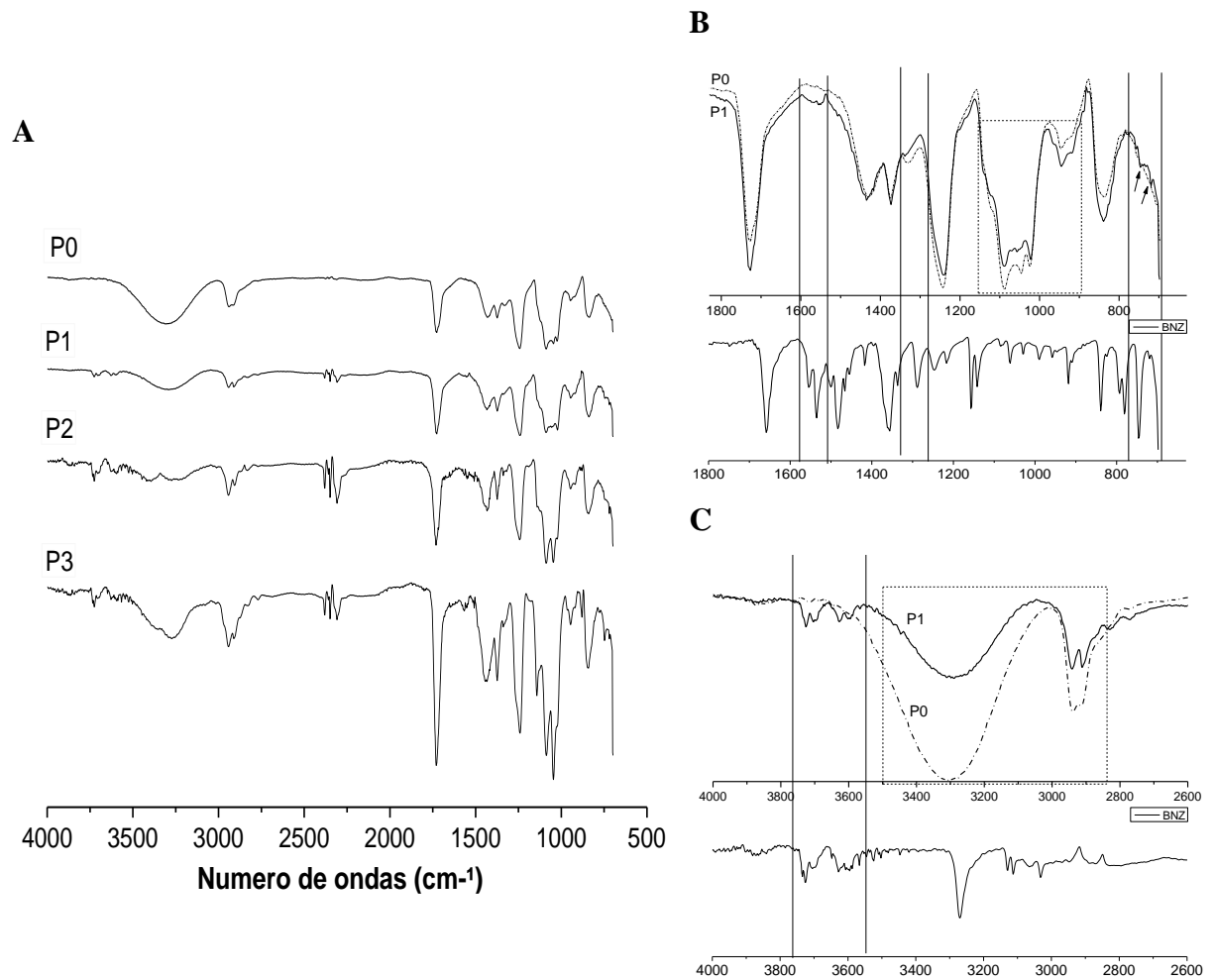
Os espectros dos compostos puros de nanopartículas mostrou semelhante a partir da mistura física em relação a fármaco: proporção de polímero de 1:4, com evidentes picos do polímero (Figura 15).



**Figura 15-** Espectros das misturas físicas dos constituintes das nanopartículas

Nas nanopartículas, para todos os sistemas (NP sem fármaco (P0), NP com fármaco (P1), NP com BNZ e COL (P2), NP com BNZ e AS (P3), evidenciam-se picos que confirme a presença de cada composto, mas também são evidentes os picos característicos do polímero, demonstrando que a estrutura química da superfície das nanopartículas é semelhante à da EUD, tais como bandas de estiramento -OH significativas próximos 3,200 centímetro<sup>-1</sup>, bandas de = O alongamento do éster em cerca de 1,730 centímetro<sup>-1</sup>; característica de vibrações de hidrogénio das moléculas de água adsorvida sobre a superfície, que mostram a incorporação da matriz polimérica BNZ (Figura 16A). P1 foram absorvidos quase as mesmas bandas que P0. Um aumento foi feito para esses dois sistemas para melhor localização das regiões de interação do fármaco em P1, comparado a P0, que pode ser isto nas Figura 16B e 16C, onde é possível observar a incorporação do BNZ em P1 nas regiões em torno de 1100-1200 cm<sup>-1</sup> e na Fig. 15C em regiões 3600-3800 cm<sup>-1</sup>.

Os resultados com os espectros de IV mostram que têm pouca fármaco incorporada na matriz do polímero e que tem interação química entre o polímero e baixa de fármaco, o que é interessante, porque não há nenhum risco de perda de atividade do BNZ.



**Figura 16-** Espectros das nanopartículas: A) NPs sem BNZ (P0), com BNZ (P1), com BNZ e COL (P2) e com BZN e AS (P3). B e C) Bandas específicas entre P0 e P1.

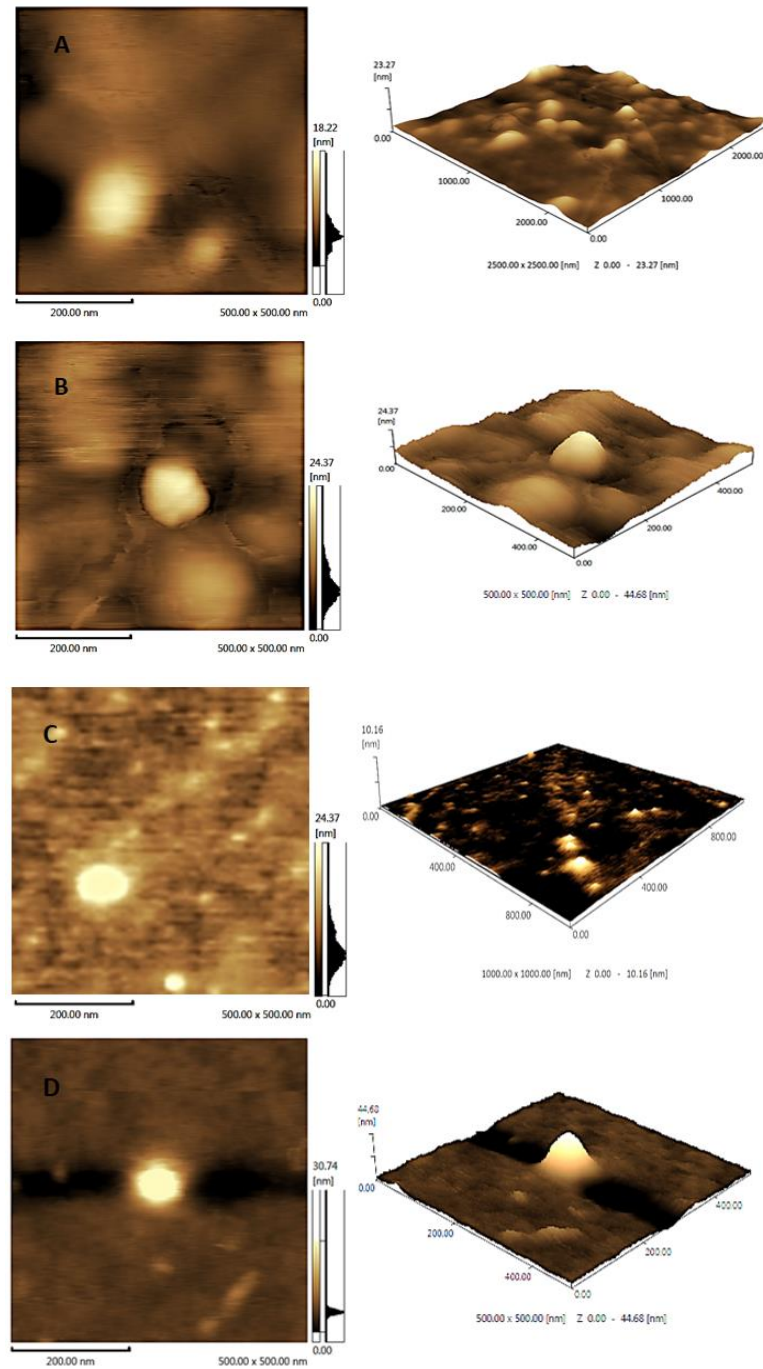
Mainardes et al (2006), em estudo semelhante com Prazinquantel e EUD indicaram que houve uma baixa interação molecular entre o polímero e o fármaco, por razões semelhantes. Os resultados com os espectros de IV mostram que a fármaco pode ser incorporada na matriz de polímero e que a fusão não ocorre por forte interação química entre o polímero e fármaco, o que é interessante, porque diminui o risco de perda de atividade do BNZ.

#### 6. 9. 11 Análise da Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para verificar a topografia das nanopartículas foi realizada uma AFM. O tamanho de partícula mediano lateral, para todos os sistemas foi de aproximadamente 125 nm, inferior aos valor encontrado por DLS (Fig. 17). Hoo et al (2008) em estudo sobre a comparação dos métodos de microscopia de força atômica (AFM) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) para

caracterizar distribuições de tamanho de nanopartículas, mostram que o DLS pode deixar de detectar as partículas menores, porém varreduras de AFM mostram uma representação mais precisa de cada partícula individual. Isso ocorre porque quando a ponta de AFM se movimenta, a forma da ponta vai contribuir na formação da imagem, o que justifica a diferença de diâmetro de partícula entre os dois métodos (HOO et al., 2008; KIM et al., 2008). Em DSL a medição é feita levando em consideração o raio hidrodinâmico (que leva em consideração a hidratação das moléculas de água na suspensão, bem como os íons presentes), gerando um tamanho de partícula maior em comparação com AFM (LIM et al., 2013).

Para todos os sistemas, as partículas mostraram esféricas, com uma superfície lisa. Um dos motivos é devido ao surfactante, PVA. Em estudo feito por Mu e Feng (2002) sobre Vitamina E TPGS, como emulsionante para a produção de nanoesferas poliméricas em que o PVA foi usada, indica que o agente tensoativo foi muito importante para estabilizar as gotículas da fase dispersa, uma vez que a linha de cima da superfície de gota gera partículas mais esféricas, promovendo a estabilidade por abaixamento da energia livre na interface entre as duas fases.



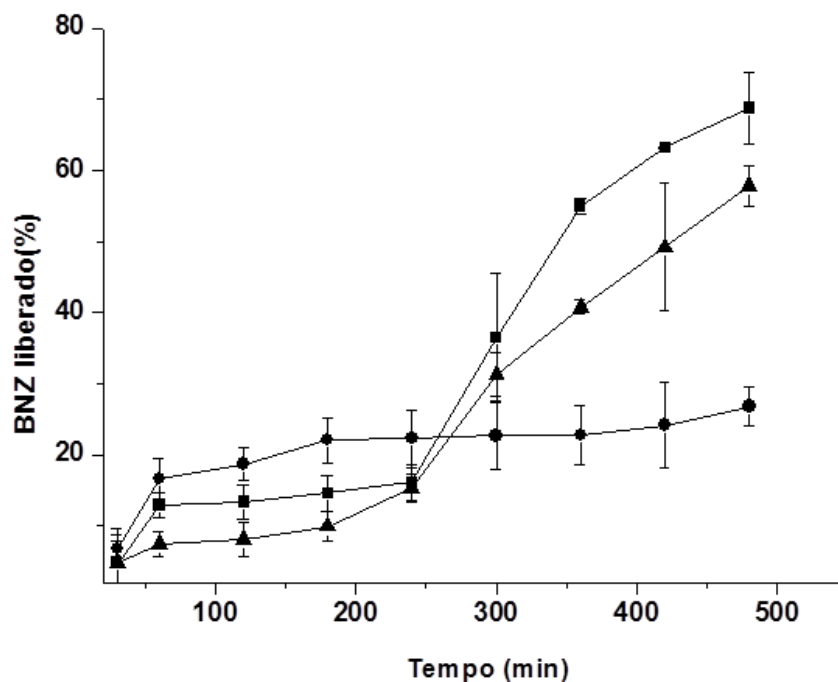
**Figura 17**-Imagem de AFM de nanopartículas de BNZ em 2D e 3D. A) NPs sem fármaco; B) NPs com BNZ; C) NPs com BZN e AS; D) NPs com BNZ e COL. A topografia foi observada com um deslocamento de frequência de 1HZ e uma amplitude de oscilação do braço de suporte 5000 nm. A escala indica a altura topográfica.

### 6.9.12 Estudo de Liberação *in vitro*

A partir dos ensaios de liberação *in vitro* foi observado o efeito da associação de BNZ em nanopartículas de EUD. Neste ensaio observa-se uma liberação de aproximadamente 28% do fármaco nas nanopartículas contendo apenas o fármaco, 70% nas nanopartículas funcionalizadas com colesterol e 60% nas nanopartículas funcionalizadas com ácido siálico. Sugere-se que as nanopartículas com o fármaco sem modificação de superfície não conseguem passar facilmente através dos poros da membrana devido a sua hidrofobicidade e, assim, é possível observar uma menor liberação nas nanopartículas contendo apenas o BNZ. Como o ácido siálico e o colesterol são menos hidrofóbicos que o BNZ, conseguem formar canais aquosos temporários (poros) que facilitam a passagem do fármaco através da membrana, por isso apresentaram uma maior taxa de liberação (DE MELO et al., 2010).

Outro fator que está associado com uma taxa de liberação reduzida BNZ devido a esta molécula estar ligada ao polímero, o que provoca uma menor difusão da molécula para o compartimento receptor (ROMERO-CANO; VINCENT, 2002).

A Figura 18 mostra a curva de percentagem de liberação para a molécula BNZ em nanopartículas em função do tempo (480 min).



**Figura 18-** BNZ liberação cumulativa (%) nanopartículas de BNZ (●), nanopartículas de BNZ com AS (▲) e nanopartículas de BNZ com COL

A fim de determinar se o mecanismo de liberação do BNZ de nanopartículas de EUD, os dados experimentais foram ajustados matematicamente por diferentes modelos e constantes cinéticas (COSTA, 2002; SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2006; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

Apesar de ter aplicado os dados experimentais em diferentes modelos matemáticos, um ajuste linear ótimo foi alcançado de forma mais eficiente pelo modelo Korsmeyer-Peppas. Os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) obtidos para BNZ estão contidos na Tabela 2.

**Tabela 2-** Modelos matemáticos usados para descrever a cinética de liberação do BNZ

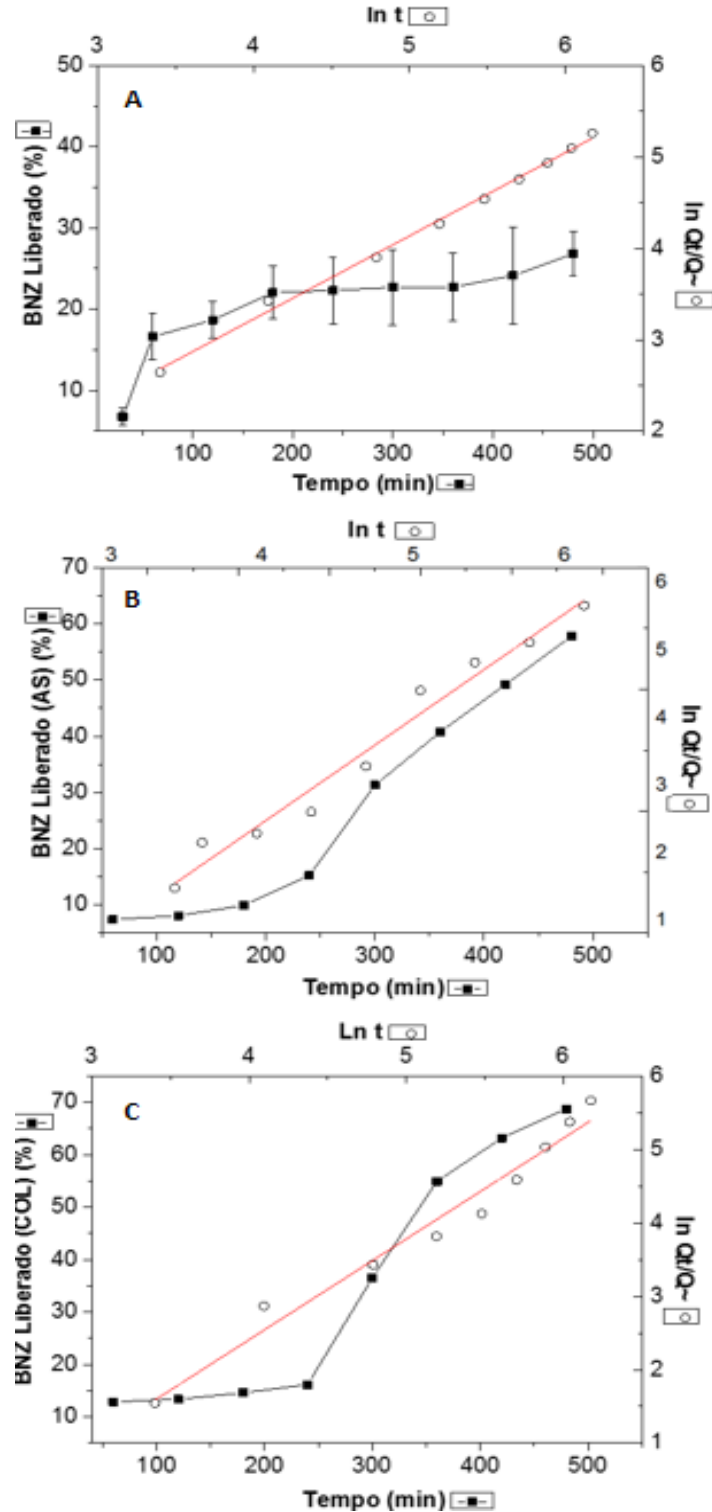
Modelo	Equação	$R^2$		
		BNZ	AS	COL
Zero Ordem	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	0,8837	0,8780	0,9069
Primeira Order	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$	0,8600	0,0542	0,9122
Weibull	$\log \left\{ -\ln \left[ 1 - (Q_t / Q_\infty) \right] \right\} = b \times \log t - \log a$	0,9399	0,8453	0,8569
Higuchi	$Q_t = K_H \times t^{1/2}$	0,9108	0,7949	0,8138
Korsmeyer-Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_K \times t^n$	0,9957	0,9716	0,9670

O modelo Korsmeyer-Peppas é um modelo semi-empírico que correlaciona a liberação da fármaco em função do tempo para uma única equação exponencial e foi usado para avaliar os dispositivos poliméricos para a liberação controlada de fármacos, especialmente quando o mecanismo de liberação não é conhecido ou quando há mais do que um mecanismo envolvido (SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2006).

A fim de determinar se o mecanismo de liberação BNZ nanopartículas não segue a lei de Fick e segue um comportamento anormal, tal modelo foi aplicado. Seguindo equação contida na Tabela 4,  $Q_t$  é a quantidade de fármaco libertado num dado instante  $t$ ,  $Q_\infty$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo infinito,  $k$  representa a constante cinética e  $n$  é o expoente de liberação. O valor de  $n$  está relacionado com a forma geométrica do sistema para liberação e determina tal mecanismo;  $n$  é igual a 0,45 para os processos controlados por difusão, enquanto que os valores de  $n$  entre 0,45 e 1,0 indicam um transporte anômalo não Fickniano. Sabe-se também que os sistemas de entrega porosos podem ter valores de  $n < 0,45$ , sendo devida a uma

combinação de processos de difusão através da matriz do polímero e difusão através dos poros parcialmente cheios com água no interior da matriz (COSTA, 2002).

De acordo com este modelo Peppas, uma curva foi obtida pela liberação de BNZ nanopartículas sem e com funcionalização com AS e COL (Figura 19).

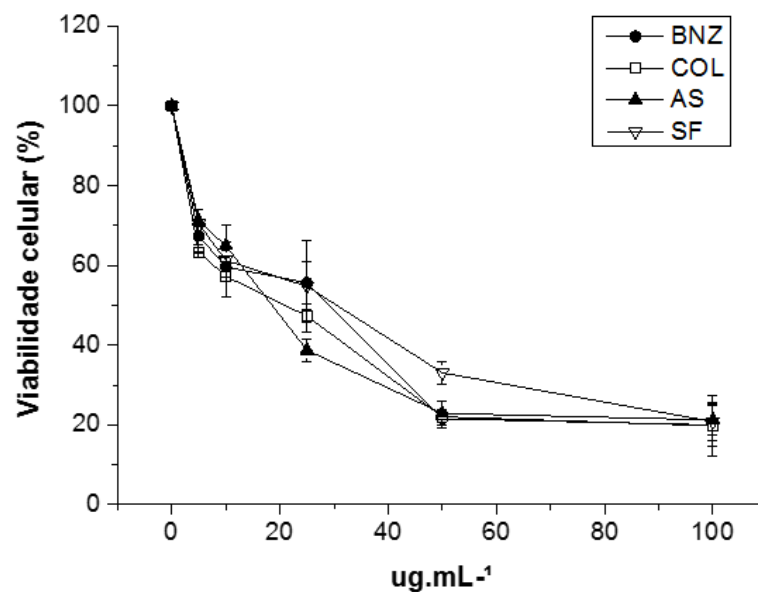


**Figura 19-** BNZ liberado (%) das nanopartículas A) sem funcionalização; B) funcionalizadas com AS e D) funcionalizadas com COL. Os símbolos indicam (●) para a liberação do BNZ em função do tempo e (○) para a curva  $\ln Q_t / Q_\infty$  uma função de  $\ln t$ , de acordo com o modelo Korsmeyer-Peppas ( $n = 3$ )

O resultado de regressão linear mostra um valor de liberação do expoente  $n = 4,74$  ( $R = 0,9957$ ) e  $0,109 \text{ min}^{-1}$  para os sistemas contendo apenas o BNZ;  $n = 3,08$  ( $R = 0,9716$ ) e  $0,137 \text{ min}^{-1}$  para os sistemas funcionalizados com ácido siálico e  $n = 3,32$  ( $R = 0,9670$ ) e  $0,260 \text{ min}^{-1}$  para os sistemas funcionalizados com colesterol, todos para uma taxa de liberação constante (k). O resultado do valor de n para o sistema apenas com BNZ revela que o BNZ é libertado devido ao transporte anômalo não regulada por difusão de Fick (COSTA, 2002). Para os sistemas funcionalizados, o valor de n apresentou-se menor que 0,45, caracterizando sistemas porosos, como descrito por Peppas (1985), em que há uma combinação de processos de difusão através da matriz do polímero e difusão através dos poros parcialmente cheios com água no interior da matriz. O que pode justificar a maior difusão e, conseqüentemente, maior liberação do BNZ das nanopartículas funcionalizadas.

### 6.2.13 Estudo de viabilidade celular

Todos os sistemas nanoparticulados (NP sem BNZ; NP com BNZ, NP com BNZ e AS; NP com BNZ e COL) foram testadas em linhagem de células Vero, em 24h, variando a concentração de 5, 10, 25, 50 e  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os resultados mostram que a viabilidade celular relativa apresenta perfil próximos entre os sistemas (Figura 20).



**Figura 20-** Viabilidade celular relativa das nanopartículas sem fármaco (SF), com Fármaco (BNZ), com fármaco funcionalizadas com ácido siálico (AS) e com fármaco funcionalizadas com colesterol (COL).

Para todos os sistemas, até mesmo para o sistema sem fármaco, nas concentrações 5 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não induziram decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao valor do controle, DMSO puro. Mesmo na maior concentração utilizada, os valores de viabilidade celular deram em torno de 20%. As concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  induziram a nível reduzido e aceitável de citotoxicidade e não induziram valores superior a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparados ao controle negativo. Este fato aconteceu apenas para as concentrações abaixo de 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Embora os polímeros catiônicos como o Eudragit possam apresentar citotoxicidade, nas condições experimentais avaliadas, as nanopartículas não apresentaram citotoxicidade e, possivelmente, não afetam o metabolismo e a viabilidade celular.

## 7 CONCLUSÕES

O método de emulsificação com evaporação do solvente foi otimizado com sucesso para produzir nanopartículas catiônicas para liberação modificada benznidazol. Os parâmetros avaliados demonstraram uma importante influência, refletindo, principalmente, na média de tamanho de partícula, resultando em valores de aproximadamente 200nm e potencial zeta, com valores em torno de +25mV. O solvente orgânico demonstrou ser um fator importante na obtenção de partículas de menores distribuição de tamanho, devido a maior taxa de difusão do solvente para a fase aquosa. As análises de AFM, IV e a cinética de liberação *in vitro* sugerem a possibilidade de aplicação das nanopartículas com elevada especificidade de fármacos em sistemas de liberação dirigidos órgãos-alvo e que a presença de ácido siálico e colesterol auxilia numa maior liberação do fármaco através da formação de poros. O estudo de estabilidade mostrou que o sistema não sofreu fenômenos de instabilidade durante o período de 6 semanas. Os resultados de viabilidade celular indicam que em baixas concentrações as células não têm sua viabilidade afetada. Isto demonstra que as nanopartículas obtidas podem ser utilizados como um potencial sistema para o tratamento da doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUSTÍ, R.; GIORGI, M. E.; DE LEDERKREMER, R. M. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* efficiently transfers  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)-linked N-glycolylneuraminic acid to terminal  $\beta$ -galactosyl units. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 16, p. 2465–2469, 2007.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1-2, p. 142–147, 2009.
- BLUME, A. et al. Donor substrate binding to trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* as studied by STD NMR. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 12-13, p. 1904–1909, 2007.
- BRANCH, S. K. **Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH) Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003; Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 Maio 2003.**, 2003.
- BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 367–375, 2007.
- CAMPO, V. L. et al. Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 145–156, 2012.
- CARVALHO, T. M. DE. Technical of discharge measurement through conventional and non conventional means. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 01, n. 01, p. 73–85, 2008.
- CHORNY, M. et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: Effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 3, p. 389–400, 2002.
- COSTA, P. J. C. DA. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141–153, 2002.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review Acta Tropica**, 2010.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on chagas disease chemotherapy Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2002.
- COURNARIE, F. et al. Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions: Comparison of the performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 3, p. 477–482, 2004.
- DALE, P. J.; KIJLSTRA, J.; VINCENT, B. Adsorption of non-ionic surfactants on hydrophobic silica particles and the stability of the corresponding aqueous dispersions. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 21, n. 26, p. 12250–12256, 2005.
- DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 9, p. 771–782, 2008.

- DE MELO, N. F. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.
- DE OLIVEIRA, A. M. et al. Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 1092–1102, 2013.
- DIAS, L. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.
- FECZKÓ, T. et al. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 8, p. 846–853, 2011.
- FELICES, A. R. Hidráulica y Mecánica de los Fluidos. In: **Hidráulica de Tuberías y Canales**. [s.l: s.n.]. p. 530.
- GUHAGARKAR, S. A.; MALSHE, V. C.; DEVARAJAN, P. V. Nanoparticles of polyethylene sebacate: a new biodegradable polymer. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 935–942, 2009.
- GUZMÁN, M. L.; MANZO, R. H.; OLIVERA, M. E. Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 9, p. 2424–2433, 2012.
- HAMISHEHKAR, H. et al. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 340–349, 2009.
- HASMAM, F. P. et al. Síntese de polímeros biodegradáveis para a preparação de nanopartículas poliméricas para uso na área médica. **International Journal**, p. 1248–1250, 2009.
- HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. [s.l: s.n.]. v. 5
- HOFFMANN, F. et al. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 189–198, 1997.
- HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 89–96, 2008.
- ICH. Validation of a analytical Procedures : text and methodology Q2(R1). **Guidance**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.
- JANA, U. et al. Preparation and in vitro characterization of Felodipine loaded Eudragit ® RS100 nanoparticles. **Innovare Academic Sciences**, v. 6, n. 4, p. 4–7, 2014.
- JAVADZADEH, Y. et al. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 498–502, 2010.
- KIM, H. S. et al. Multiple light scattering measurement and stability analysis of aqueous carbon nanotube dispersions. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 69, n. 5-6, p. 1209–1212, 2008.
- KROPF, S. P. **Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962)São Paulo em Perspectiva**, 2005.

- KWON, H. Y. et al. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 182, n. 1-3, p. 123–130, 2001.
- LAMAALLAM, S. et al. Formation and stability of miniemulsions produced by dispersion of water/oil/surfactants concentrates in a large amount of water. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 270-271, n. 1-3, p. 44–51, 2005.
- LANGER, K. et al. Methylmethacrylate sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles for drug delivery. Part III: Evaluation as drug delivery system for ophthalmic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, n. 2, p. 219–231, 1997.
- LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1-2, p. 33–43, 2007.
- LEMARCHAND, C. et al. **Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan** International Journal of Pharmaceutics. **Anais...**2003a
- LEMARCHAND, C. et al. Novel polyester-polysaccharide nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 8, p. 1284–1292, 2003b.
- LIM, J. et al. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 381, 2013.
- LIN, R.; NG, L. S.; WANG, C. H. In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4476–4485, 2005.
- MEHROTRA, A.; NAGARWAL, R. C.; PANDIT, J. K. Lomustine loaded chitosan nanoparticles: characterization and in-vitro cytotoxicity on human lung cancer cell line L132. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 59, n. 3, p. 315–320, 2011.
- MEZENCEV, R. et al. Trypanosoma cruzi: Antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 66–69, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso brasileiro em doen??a de chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 38 Suppl 3, n. Suplemento III, p. 7–29, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria N° 971, De 15 De Maio De 2012. p. 67–71, 2012.
- MOBARAK, D. H.; SALAH, S.; ELKHESHEN, S. A. Formulation of ciprofloxacin hydrochloride loaded biodegradable nanoparticles: optimization of technique and process variables. **Pharmaceutical development and technology**, v. 19, n. 7, p. 891–900, 2014.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery** International Journal of Pharmaceutics, 2010.
- MOUSTAFINE, R. I.; ZAHAROV, I. M.; KEMENOVA, V. A. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit?? E PO/Eudragit?? L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 1, p. 26–36, 2006a.
- MOUSTAFINE, R. I.; ZAHAROV, I. M.; KEMENOVA, V. A. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit?? E PO/Eudragit?? L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 1, p. 26–36, 2006b.

MU, L.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>). **Journal of Controlled Release**, v. 80, n. 1-3, p. 129–144, 2002.

NG, S.-F. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 26, n. 2, p. 443–486, 2010.

PALMEIRO-ROLDÁN, R. et al. Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1-2, p. 110–117, 2014.

PARKER, E. R.; SETHI, A. **Chagas disease: Coming to a place near you** *Dermatologic Clinics*, 2011.

PELIZZARO-ROCHA, K. J. et al. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 36–39, 2010.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. **Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2007.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–91, 2012.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. **Nanotechnological approaches against Chagas disease** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010.

ROMERO-CANO, M. .; VINCENT, B. **Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles** *Journal of Controlled Release*, 2002.

SALOMON, C. J. **First century of Chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos** *Química Nova*, 2003.

SCHAUER, R. **Sialic acids: Fascinating sugars in higher animals and man** *Zoology. Anais...* 2004

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control** *Trends in Parasitology*, 2006.

SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N. A. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. **Biomaterials**, v. 27, n. 31, p. 5440–5451, 2006.

SHIOKAWA, T. et al. Effect of polyethylene glycol linker chain length of folate-linked microemulsions loading aclacinomycln a on targeting ability and antitumor effect in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 2018–2025, 2005.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. **Mathematical modeling of drug delivery** *International Journal of Pharmaceutics*, 2008.

- SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. **Moléstia de Chagas e ecologia profunda: a “luta antivetorial” em questão** *Ciência & Saúde Coletiva*, 2011.
- SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Rev. patol. trop**, v. 36, n. 2, p. 103–118, 2007.
- SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1534–1538, 2011.
- SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 70, n. 1-2, p. 1–20, 2001a.
- SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 70, n. 1-2, p. 1–20, 2001b.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.
- TERAYAMA, H. et al. Effect of dilution on aqueous dispersion of drug particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27, n. 3/2, p. 177–180, 2003.
- THIOUNE, O. et al. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 146, n. 2, p. 233–238, 1997.
- URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55–68, 2010.
- VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.
- VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas no Brasil** *Cadernos de Saúde Pública*, 2000.
- WANG, L. et al. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 330, n. 2, p. 443–448, 2009.
- WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. **Physical and chemical stability of drug nanoparticles** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011.
- ZHANG, X. et al. Effects of surface modification on the properties of magnetic nanoparticles/PLA composite drug carriers and in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 431, p. 80–86, 2013.