



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALINNE ÉLIDA GONÇALVES ALVES

OBTENÇÃO DE SISTEMA MICROPARTICULADO
BENZNIDAZOL:ZIF-8 PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA
OTIMIZANDO O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Recife

2016

ALINNE ÉLIDA GONÇALVES ALVES

**OBTENÇÃO DE SISTEMA MICROPARTICULADO
BENZNIDAZOL:ZIF-8 PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA
OTIMIZANDO O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife

2016

ALINNE ÉLIDA GONÇALVES ALVES

**OBTENÇÃO DE SISTEMA MICROPARTICULADO
BENZNIDAZOL:ZIF-8 PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA
OTIMIZANDO O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 24 / 02 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Magaly Andreza Marques de Lyra (Examinadora Externa)
Faculdade Estácio do Recife

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof.^a. Dr.^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a. Vânia Pinheiro Ramos

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Dedico aos meus pais Juarez Alves da Silva e Sandra Maria Gonçalves Alves.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu bom **Deus**, por ter me dado paciência, dedicação e sabedoria durante todos os momentos desta jornada. Obrigada Senhor, por fazer com que eu esteja conquistando mais essa vitória.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Pedro Rolim**, por ter permitido a realização deste trabalho, através da oportunidade e ensinamentos científicos oferecidos. Agradeço pela confiança depositada quando mais precisava.

A minha família, em especial pais **Juarez e Sandra**, e irmãos **Maike e Wesley** por estarem sempre me apoiando nas minhas decisões e dando força para que as idas e vindas a Recife se tornassem leves e não tão cansativas, sempre torcendo para que eu conseguisse atingir mais esse objetivo. Amo vocês!

Ao meu querido noivo **Gláucio Tabosa**, pelo amor e carinho, por mais que várias vezes tenha estado chateado com minha ausência e distância, sei que no fundo minha felicidade era também a sua e que estava ali torcendo por meu crescimento profissional. Obrigada pela paciência!

Aos membros do grupo de pesquisa MOF's: **Leslie Raphael**, pela paciência, apoio e o grande aprendizado que me trouxe, a **Débora Dolores e Isabela Amariz**, pela disponibilidade de estar sempre me ajudando quando necessitava de um suporte nos experimentos, que pela convivência do dia-a-dia se tornaram mais que companheiras de pesquisa. Vocês foram essenciais!

A **Lidiany Paixão**, que desde a graduação compartilha comigo a vontade de desenvolver pesquisa, que em vários momentos desta caminhada estava pronta para escutar meus momentos de desespero, mas também meus momentos de alegria. Obrigada por me ajudar a fazer parte da equipe LTM!

À família LTM: **Salvana Costa, José Lourenço, Danilo Fontes, Rosali Silva, Caio César, Magaly Lyra, Talita Atanázio, Cindy Aguilera**, por tornarem o laboratório um ambiente acolhedor e agradável.

Às amigas que nunca deixaram de estar próximas, sempre me dando força e se orgulhando de cada etapa que eu alcançava em minha vida, **Dayseanne Florêncio, Jéssica Vasconcelos, Jéssica Maria e Lucianna Rabêlo**.

Ao **Departamento de Física, Departamento de Química** e ao **CETENE**, por ter disponibilizado equipamentos para realização das mais diversas análises. Em especial ao professor **Severino Júnior**, pelo apoio e disponibilização de MOF's.

Ao **Laboratório de Gemologia do Departamento de Geologia/UFPE**, principalmente à Prof^a. Dra^a. **Sandra Brito**, pela realização das análises de Microscopia de Luz Polarizada.

E, finalmente, a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O benznidazol (BNZ) é um derivado de 2-nitroimidazol com largo espectro de atividade farmacológica antiparasitária. Um dos grandes problemas deste fármaco são as grandes doses administradas, tratamentos prolongados, bem como a alta incidência de reações adversas, o que, provavelmente, estão relacionados com a sua baixa solubilidade. Parte destes problemas pode ser reduzidos com associação do fármaco a uma estrutura que aumente a sua solubilidade e modifique a liberação do mesmo, modulando-a e prolongando a sua dissolução. Assim, esse trabalho objetivou obter e caracterizar sistemas microparticulados do BNZ a uma estrutura organometálica - *Metal Organic Framework* (MOF) chamada *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8), a fim de ser utilizada nos estudos de pré-formulação de forma farmacêutica de liberação prolongada para o tratamento alternativo da doença de Chagas. Os sistemas foram obtidos após agitação do fármaco e da ZIF-8 em diferentes solventes (água e acetona) para que fosse escolhido o melhor método, seguindo a obtenção com a secagem. Quanto às caracterizações, estas foram realizadas através de diferentes técnicas analíticas (espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, análise térmica, espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier, difratometria de raios-x, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz polarizada, tamanho de partícula por granulometria à laser, análise de área superficial e tamanho e volume de poros) para garantir a obtenção do sistema, prosseguindo com os ensaios de dissolução que evidenciaram o comportamento de liberação do BNZ em diferentes pH's quando associado aos materiais organometálicos. Os perfis de dissolução foram analisados através da área sob a curva (AUC), eficiência de dissolução (ED%) e ajuste de seus resultados quanto aos modelos cinéticos. Por meio dos métodos desenvolvidos o escolhido para obtenção foi o realizado com a acetona como solvente, onde foi possível conseguir um valor de 38% de incorporação do fármaco à ZIF-8. Através das análises térmicas, ficou comprovada a obtenção do sistema, indicando que o mesmo também pode influenciar positivamente a estabilidade térmica do fármaco. Já os espectros de FT-IR, difratogramas de DR-X e demais análises realizadas corroboraram os resultados, confirmando a formação do sistema microparticulado BNZ:ZIF-8. Com o estudo de dissolução, verificou-se que houve modulação da liberação do fármaco de acordo com o pH utilizado, onde em pH 4,5 o sistema liberou uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo, atingindo 80% de liberação em 2h, já em pH 7,6 houve uma liberação gradual atingindo essa mesma porcentagem em 7h, além dessa modulação o sistema apresentou incremento de solubilidade quando comparado ao BNZ isolado. O presente trabalho trouxe informações relevantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada que utilize o BNZ como insumo farmacêutico ativo.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Tripanossomicidas. Compostos Organometálicos. Dissolução.

ABSTRACT

The benznidazole (BNZ) is a 2-nitroimidazole derived with broad-spectrum antiparasitic drug activity. Among the problems with this drug are: large doses, long term treatment and the high incidence of adverse reactions, which are probably related to its low solubility. Many of these problems can be reduced associating the drug with a structure that increases the its solubility and modulates its release. Thus, this study aimed to obtain and characterize the BNZ microparticulate systems with a Metal Organic Framework (MOF) called *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8), to be used in pre-formulation studies of extended release dosage form, as an alternative treatment of Chagas' disease. The systems were obtained after stirring the drug and ZIF-8 in different solvents (water and acetone), followed by drying, in order to choose the best method of obtaining. The characterizations were performed using different techniques (absorption spectroscopy in the ultraviolet region, thermal analysis, absorption spectroscopy in the infrared with Fourier transform, x-ray diffractometry, scanning electron microscopy, polarized light microscopy, particle size by laser granulometry, surface area nalysis and size and pore volume) to ensure the achievement of the system. Then they were carried out dissolution tests, which showed the BNZ release behavior at different pH's when associated with organometallic materials. The dissolution profiles were analyzed by area under the curve (AUC), dissolution efficiency (DE%) and release kinetic models. The method using acetone to obtain the system reach a value of 38% of drug incorporation on ZIF-8 and it was determined as the standard obtaining method. Thermal analysis, FTIR, XRD and other analyses corroborate the results that confirms the formation of BNZ:ZIF-8 microparticulate system. With dissolution study it was found that there was modulation of drug release according to the pH used. At pH 4.5 the system released a large amount of drug in a short period of time, up to 80% release in 2 hours. At pH 7.6 there was a gradual release over time until it reaches the same percentage in 7 hours. In addition to this modulation, the system showed increased solubility when compared to the isolated BNZ. This study brought relevant information for the development of extended-release dosage forms using the BNZ as an active pharmaceutical ingredient.

Keywords: Chagas Disease. Trypanocidal Agents. Organometallic Compounds. Dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclos doméstico e selvagem da doença de Chagas descobertos por Carlos Chagas (1909-1912).	27
Figura 2 - a) Tripomastigotas circulantes; b) Ninhos de amastigotas de caso agudo da doença de Chagas; c) Sistemas de fibrose; d) Hipertrofia do miocárdio e dilatação com trombos no ápice ventricular na cardiopatia chagásica crônica.....	31
Figura 3 - 1) Nifurtimox e 2) Benznidazol.	33
Figura 4 - Três exemplos de redes zeólitas: a) Contendo um sistema de canais bidimensionais; b) Contendo cavidades; c) Contendo um sistema de canais unidimensionais.....	42
Figura 5 - Zeólitas a) Projeção ao longo do eixo-c mostrando 7 canais; b) Projeção ao longo do eixo-c mostrando células unitárias em forma de poliedro; c) Seção mostrando as diferentes posições catiônicas; d) Visão de anéis formando canais ao longo do eixo c; e) Imagem de microscopia eletônica de varredura de cristais de zeólita.....	42
Figura 6 - Alguns sistemas utilizados como carreadores de fármacos.....	44
Figura 7 - Representação esquemática que mostra a construção da MOF.	45
Figura 8 - a) Estrutura cristalográfica da ZIF-8, ilustrando o sítio de coordenação do íon Zn^{+2} (NC= número de coordenação) e b) Estrutura ilustrando a cavidade da ZIF-8.....	48
Figura 9 - Ilustração esquemática mostrando duas abordagens do encapsulado 5-Fluorouracil libertado da ZIF-8.....	49
Figura 10 - Modelo de agitador de dissolutor no modelo de pás	63
Figura 11 - Fluxograma para obtenção dos sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8	68

Figura 12 - Varredura do espectro de absorção na região do UV-Vis do BNZ e da ZIF-8.....	77
Figura 13 - Curvas de incorporação do BNZ à rede da ZIF-8 em água (preto) e em acetona (vermelho).....	77
Figura 14 - Curvas TG do BNZ, ZIF-8, MF e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8	81
Figura 15 - Curvas DSC do BNZ, ZIF-8, MF e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.....	84
Figura 16 - Espectros de infravermelho do BNZ, ZIF-8, MF e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.....	86
Figura 17 - Difratoogramas de raios-X do BNZ, ZIF-8, MF e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.....	88
Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Varredura: a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p); g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em meio aquoso; i) e j) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em acetona.....	91
Figura 19 - Microscopia de Luz Polarizada: a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p); g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em meio aquoso; i) e j) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em acetona.....	93
Figura 20 - Gráfico de tamanho de partícula por granulometria à laser: a) BNZ e b) ZIF-8....	94
Figura 21 - Perfil de dissolução do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 em pH 4,5	97
Figura 22 - Perfil de dissolução do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 em pH 7,6	98
Figura 23 - Perfil de dissolução do Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 em pH 4,5 e 7,6...	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos matemáticos de cinética usados na avaliação do perfil de dissolução.....	74
Tabela 2 - Concentração inicial do BNZ e concentração analisada no momento da coleta (dia 4) com respectivo desvio padrão	78
Tabela 3 - Cálculo do espaçamento basal dos picos de reflexão 011, 002 e 112 da ZIF-8, Mistura Física e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.....	89
Tabela 4 - Análise granulométrica e da área superficial, tamanho e volume de poros do BNZ e da ZIF-8.....	95
Tabela 5 - Solubilidade média de BNZ em água nos diferentes dias.....	96
Tabela 6 - Eficiências de dissolução obtidas a partir do perfil de dissolução do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8.....	99
Tabela 7 - Valores médios de AUC do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 em pH 4,5.	100
Tabela 8 - Valores médios de AUC do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 em pH 7,6	101
Tabela 9 - Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8 em diferentes pH's	102
Tabela 10 - Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8 em diferentes pH's	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASA	Análise de Área de Superfície
ATR	Reflectância Total Atenuada
AUC	Área sob a Curva
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
BNZ	Benznidazol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CRT	Tubo de Raios Catódicos
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês deoxyribonucleic acid)
DR-X	Difratometria de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Diferencial
ED	Eficiência de Dissolução
EDS	Dispersão de Energia
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FF	Forma Farmacêutica
FFSO	Forma Farmacêutica Sólida Oral
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mistura Física

MIL	Materiais do Instituto Lavoisier
MOF	Estrutura Organometálica (do inglês <i>Metal Organic Framework</i>)
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NC	Número de Coordenação
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C Reativa
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
pH	Potencial Hidrogeniônico
RE	Resolução Específica
RPM	Rotações por Minuto
S _{BET}	Área de Superfície Específica
TCD4+	Linfócito TCD4+
TCD8+	Linfócito TCD8+
TCl-Tc TVI	Linhagem do <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TG	Termogravimetria
TGI	Trato Gastrointestinal
USP	Farmacopéia Americana (do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
ZIF-8	Estrutura Imidazolato-Zinco (do inglês <i>Zeolitic Imidazolate Framework</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mg	Miligrama
®	Marca Registrada
Cr	Cromo
Fe	Ferro
g	Grama
d	Diâmetro
$d <$	Diâmetro menor que
Å	Angstrom
$d \leq$	Diâmetro menor ou igual que
$>$	Maior que
Si	Silício
Al	Alumínio
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetro
g/L	Grama por litro
g/cm ³	Grama por centímetros cúbicos
m ² /g	Metros quadrados por grama
µm	Micrômetro
Zn	Zinco
mg/mL	Miligrama por mililitro
mm	Milímetro
±	Mais ou menos
mL/min	Mililitro por minuto
cm ⁻¹	Centímetro elevado a menos 1
θ	Theta
d	Distância interplanar
cm	Centímetro
S	Enxofre

N	Nitrogênio
C	Carbono
H	Hidrogênio
Cl	Cloro
N	Nitrogênio
λ	Lambda
g/mol	Gramas por mol
g/mL	Grama por mililitro
mL	Mililitro
h	Hora
C_{Corr}	Correção da concentração
C_n	Concentração no ponto de coleta n
V_t	Volume total inicial
V_s	Volume das coletas
Σ	Somatório
C_i	Concentrações das amostras nos pontos anteriores a n
t	Tempo
R^2	Coefficiente de determinação
R^2_{Ajustado}	Coefficiente de determinação ajustado
Q_t	Quantidade de fármaco liberado no tempo t
Q_0	Quantidade inicial de fármaco em solução
Q_∞	Quantidade de fármaco dissolvido no tempo total
M_t	Quantidade de fármaco dissolvido no tempo t
M_∞	Quantidade de fármaco dissolvido quando a forma farmacêutica se desintegra completamente
K	Constante
ml.min ⁻¹	Mililitro por minuto
°C.min ⁻¹	Graus Celsius por minuto
d	Espaçamento basal
sem θ	Seno do ângulo Theta
n	Coefficiente de liberação
°	Graus
mL/h	Mililitro por hora

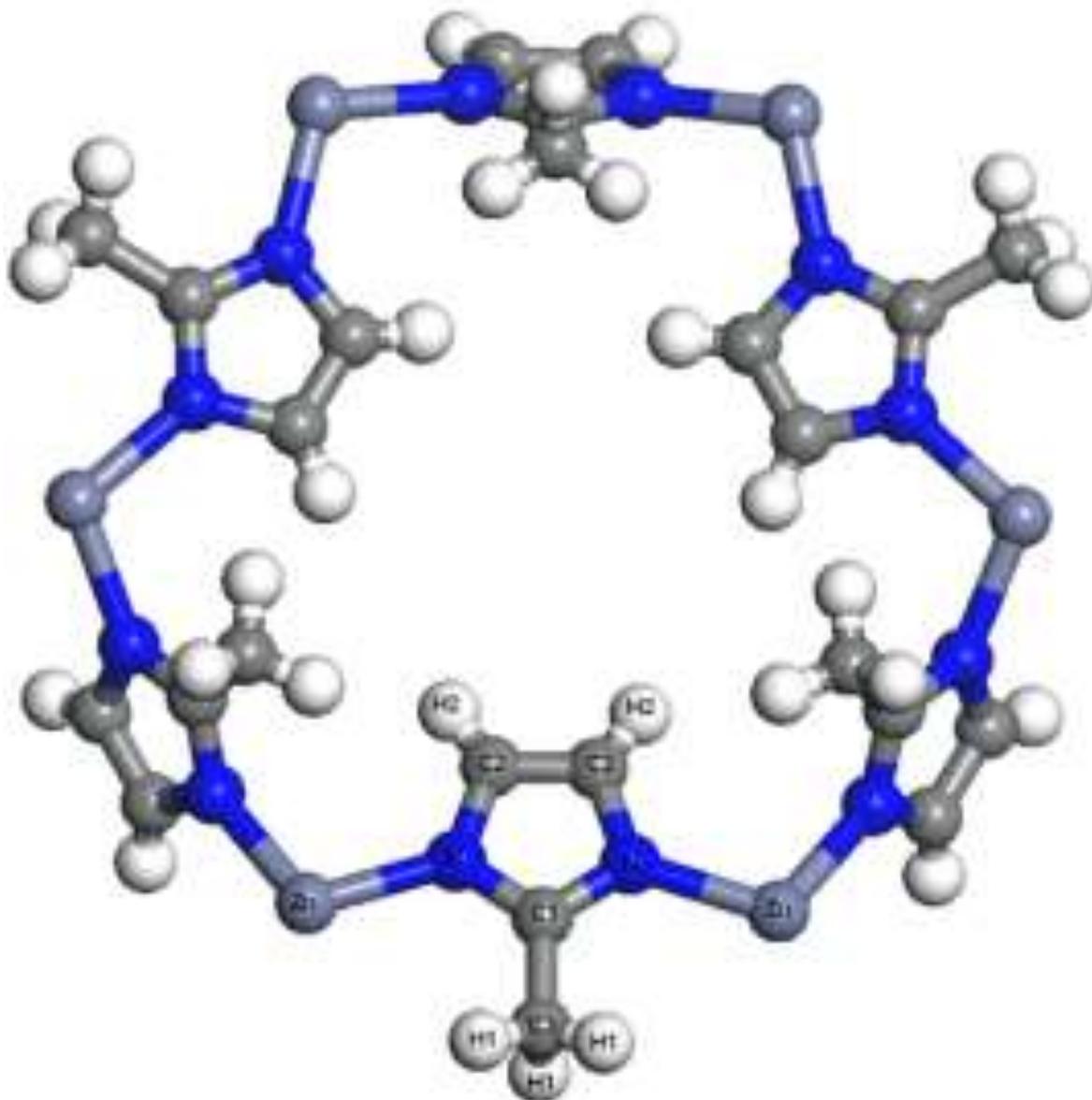
K	Kelvin
$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
ΔH	Varição de entalpia
mJ	Milijoule
J	Joule
p/p	Relação concentração peso – peso
mol/mol	Mol por mol
m^2/mL	Metros quadrados por mililitro
cm^3/g	Centímetros cúbicos por grama
$\text{min}\cdot\mu\text{L}/\text{mL}$	Minuto por microlitro por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
3 REFERENCIAL TEÓRICO	26
3.1 Doença de Chagas	27
3.2 Benznidazol.....	32
3.3 Excipientes	35
3.4 Liberação prolongada.....	37
3.5 Materiais porosos	41
3.6 <i>Metal Organic Framework</i> (MOF)	43
3.7 <i>Zeolitic Imidazolate Framework</i> (ZIF-8)	47
3.8 Caracterização de materias farmacêuticos.....	49
3.9 Ensaios de dissolução.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1 Material	67
4.2 Obtenção do Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8	67
4.3 Caracterização do Benznidazol, Mistura Física e Sistemas microparticulados	69
4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	69
4.3.2 Análise Térmica.....	69
4.3.2.1 <i>Termogravimetria (TG)</i>	69
4.3.2.2 <i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	70
4.3.3 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	70
4.3.4 Difratomia de Raios-X (DR-X)	70
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
4.3.6 Microscopia de luz polarizada.....	71

4.3.7 Tamanho de partícula por granulometria à laser, análise de área superficial e tamanho e volume de poro	71
4.3.8 Ensaio quantitativo de solubilidade.....	72
4.4 Estudo dos perfis de dissolução <i>in vitro</i>	72
4.4.1 Tratamento de dados.....	73
4.4.2 Modelos cinéticos	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Obtenção do Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8	76
5.1.1 Aspecto macroscópico.....	76
5.1.2 Avaliação da incorporação do fármaco na ZIF-8 na proporção 1:1	76
5.2 Caracterização do Benznidazol, Mistura Física e Sistemas microparticulados	79
5.2.1 Análise Térmica.....	79
5.2.1.1 Termogravimetria (TG/DTG)	79
5.2.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	82
5.2.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	84
5.2.3 Difratomia de Raios-X (DR-X)	86
5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	89
5.2.5 Microscopia de luz polarizada.....	92
5.2.6 Tamanho de partícula por granulometria à laser, análise de área superficial e tamanho e volume de poro	94
5.2.7 Ensaio quantitativo de solubilidade.....	95
5.3 Estudo dos perfis de dissolução <i>in vitro</i>	96
5.3.1 Tratamento de dados.....	96
5.3.2 Modelos cinéticos	101
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
REFERÊNCIAS.....	107

APÊNDICE	122
ANEXOS	125



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada endêmica da América Latina que atinge em torno de oito milhões de pessoas. É uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e constitui o maior problema de saúde pública para as nações em desenvolvimento. No entanto, países não endêmicos como Estados Unidos, Canadá, Japão também têm registrado casos devido ao movimento migratório da população infectada. Esse aumento do número de casos e maior distribuição espacial constitui um desafio por não existir tratamento e diagnóstico adequados (COURA e VIÑAS, 2010; WHO, 2013).

O benznidazol, quimicamente (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) (BNZ), é um derivado de 2-nitroimidazol com largo espectro de atividade farmacológica antiparasitária. É o único fármaco disponível para tratamento da doença de Chagas em países como o Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. O BNZ não é tido como o fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas, visto que apresenta baixa solubilidade em água e alta toxicidade, podendo ocasionar algumas reações adversas graves como dermatite por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica. Entretanto, é utilizado na fase aguda com chances de cura e na fase crônica da doença prevenindo a progressão da doença. Reduz a quantidade de recursos médicos utilizados pelo paciente durante a vida, economizando recursos do sistema de saúde, quando comparado com a não utilização do BNZ (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; LEITE et al., 2009; SAGGIA; SANTOS; DIETZE, 2007; SOARES-SOBRINHO, 2009).

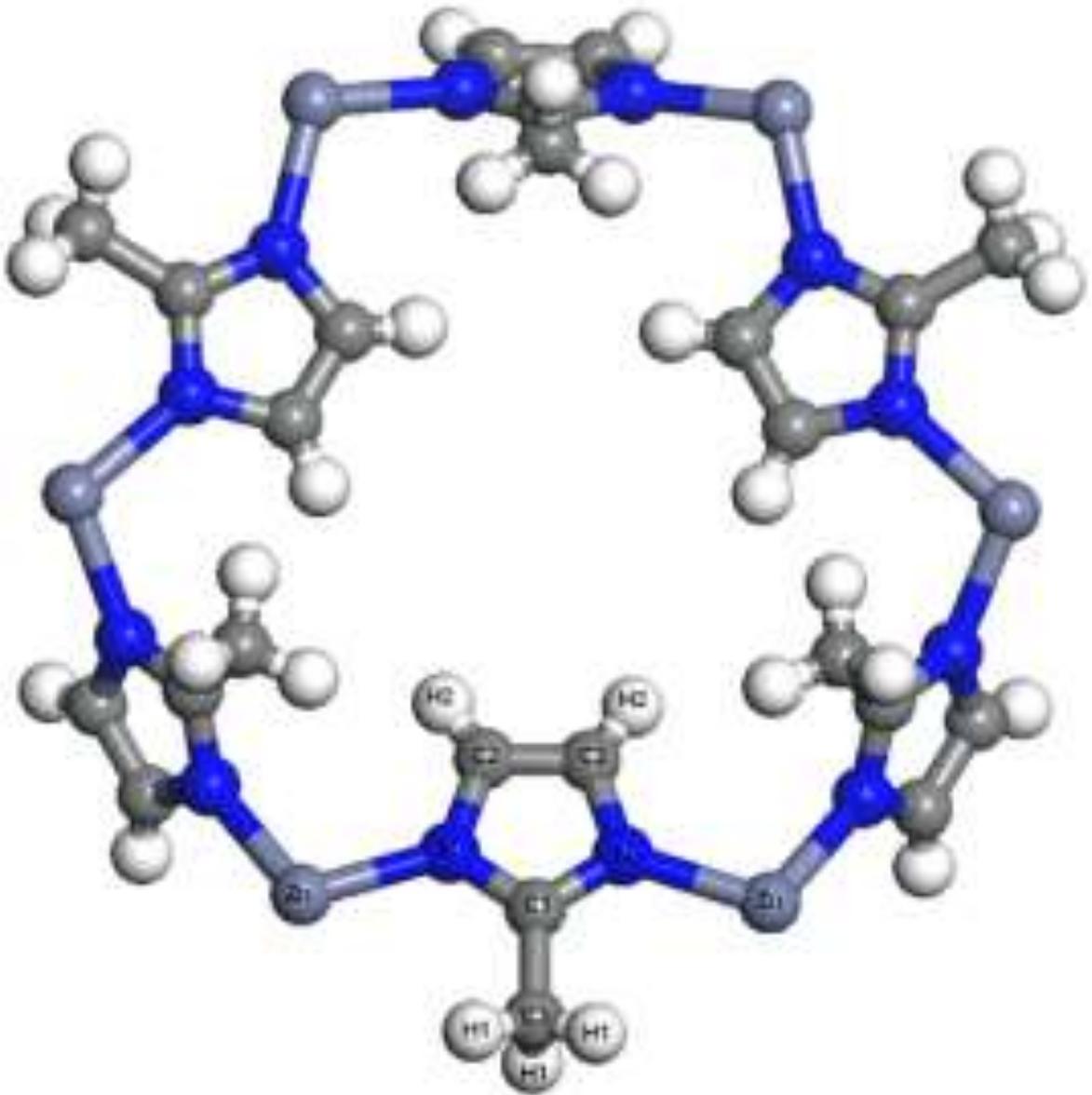
Neste contexto, os excipientes farmacêuticos possibilitam, entre outras funções, aumentar a estabilidade química, física e microbiológica ao fármaco e melhorar a disponibilidade biológica do mesmo. O tradicional conceito de excipiente, como sendo simples adjuvante e veículo, química e farmacologicamente inerte, vem se tornando obsoleto. Atualmente, os excipientes são considerados constituintes essenciais da formulação, capazes de garantir o bom desempenho do medicamento e otimizar o alcance e manutenção do efeito terapêutico (LIMA et al., 2011; PESSANHA et al., 2012).

A partir dos entraves tecnológicos apresentados, faz-se necessário o desenvolvimento de novos excipientes farmacêuticos capazes de incrementar a solubilidade em água de fármacos pouco solúveis e protegê-los físico-quimicamente. Diversos sistemas para liberação controlada de fármacos têm sido descritos, entre eles, as redes organometálicas de coordenação, do inglês *Metal Organic Framework* (MOF), obtidas a partir de compostos híbridos. Os materiais

inorgânicos apresentam propriedades promissoras para serem utilizados como carregadores, tais como boa biodisponibilidade, baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, alta capacidade de inserção de espécies iônicas, possibilidade de funcionalização da superfície, aumento da estabilidade das espécies inseridas e promoção de sua liberação sustentada (CUNHA et al., 2010; PESSANHA et al., 2012).

Pertencente a um subgrupo de MOF's, têm-se *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8), um imidazolato zeolítico que possui diversidade estrutural e estabilidade excepcional. São materiais que apresentam propriedades estruturais atraentes e grande potencial de armazenamento de produtos químicos, encapsulação e entrega controlada, além de apresentar outra característica muito importante, a baixa toxicidade (KARAGIARIDI et al., 2012; KÜSGENS et al., 2009).

Logo, o desenvolvimento de sistemas BNZ:MOF utilizando excipientes que possibilitem a liberação modificada permite melhor controle da cinética de liberação do fármaco de seu respectivo carreador. Nesse aspecto, é possível estabelecer níveis plasmáticos terapêuticos constantes, com menores efeitos tóxicos (CUNHA et al., 2010; PESSANHA et al., 2012).



OBJETIVOS

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

2 OBJETIVOS

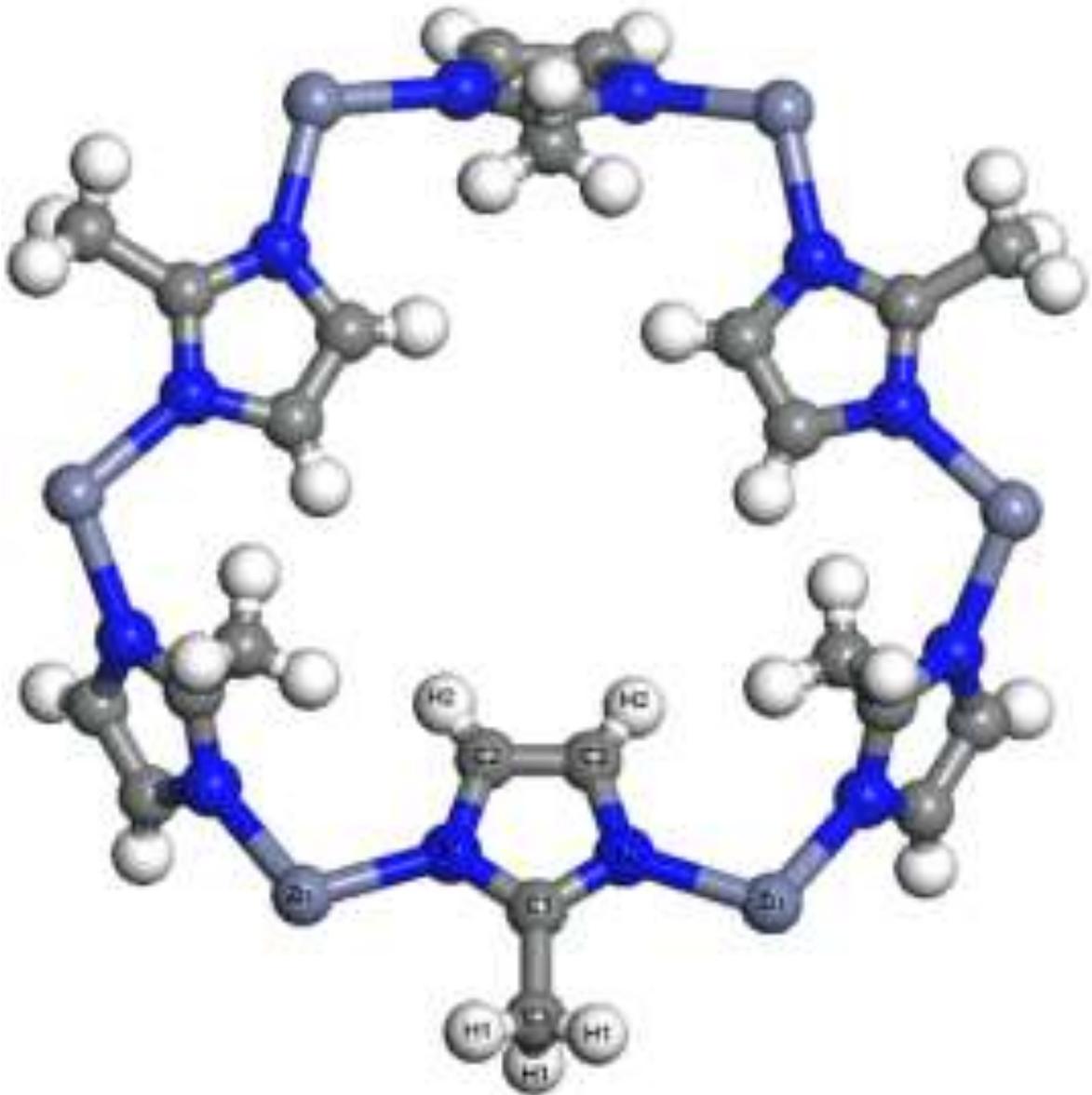
Os objetivos que norteiam o presente trabalho estão descritos abaixo, classificando-os em geral e específicos.

2.1 Objetivo geral

Obter e caracterizar o sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 a ser utilizado nos estudos de pré-formulação de forma farmacêutica de liberação prolongada para o tratamento alternativo da doença de Chagas.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método para obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1, 1:3 e 3:1);
- Obter a partir de um planejamento misturas físicas (MF) e sistemas BNZ:ZIF-8 em diferentes proporções;
- Caracterizar o BNZ, MOF, MF e sistemas através de diversas técnicas analíticas;
- Realizar estudo de dissolução *in vitro* do BNZ, do sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 escolhida como a melhor obtenção e de suas respectivas MF nas condições *sink*, a fim de avaliar o perfil de liberação do fármaco.



REFERENCIAL TEÓRICO

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

3 REFERENCIAL TEÓRICO

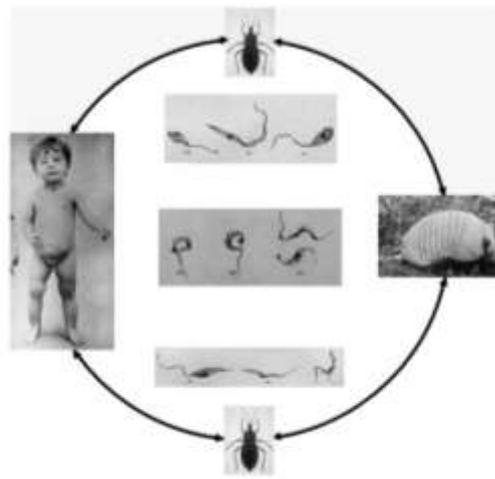
O embasamento teórico, que diz respeito ao trabalho realizado, está disposto a seguir.

3.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta pelo médico sanitarista Carlos Chagas, em 1909, em um vilarejo chamado Lassance, no sertão mineiro. Por este vilarejo, passava um trecho da estrada de ferro central do Brasil, a qual se propunha unir, por ferrovia, o norte e o sudeste do Brasil, de Belém do Pará ao Rio de Janeiro. As obras estavam paralisadas, por causa da habitual malária, que mais tarde Chagas descobriu que se tratava de outra doença que se caracterizava pelas palpitações, sensação que os corações das pessoas doentes não batiam normalmente (NEVES, 2005; SCLIAR, 2002).

Em fevereiro de 1909, o médico, após isolar o parasita *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado da família Trypanosomatidae e da ordem Kinetoplastida, concluiu todo o ciclo biológico da doença e posteriormente a identificação do vetor (Figura 1), através de uma menina de 2 anos, Berenice. A menina apresentava febre alta e inchume no rosto e corpo, após exame microscópico da doente, observou a presença de *T. cruzi*. Em homenagem ao médico, a doença foi denominada como doença de Chagas (NEVES, 2005; SCLIAR, 2002; SOARES-SOBRINHO, 2009).

Figura 1 - Ciclos doméstico e selvagem da doença de Chagas descobertos por Carlos Chagas (1909-1912).



Fonte: COURA e BORGES-PEREIRA, 2010.

A história natural da doença de Chagas começou como uma doença enzoótica entre os animais selvagens, e isso ainda persiste em algumas áreas, como a região amazônica. Quando a humanidade se aventurou em ecótopos naturais da infecção, começou a ser transmitida acidentalmente para os seres humanos como uma antropozoonose. Devido ao extenso desmatamento para utilização das terras para agricultura e criação de gado ao longo dos últimos 200-300 anos na América Latina, triatomíneos, que ficaram sem suas fontes de alimentos devido à remoção de animais selvagens, começaram a colonizar áreas circundantes as utilizadas para habitações humanas, e as próprias habitações. Eles se adaptaram a este novo nicho, incluindo a alimentação do sangue de humanos e animais domésticos, além de ter sofrido alterações morfológicas e funcionais, desenvolvendo um flagelo e uma membrana ondulante tornando-os capazes de circular no sangue de vertebrados (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

Essa doença passou a ser um problema de saúde pública na América Latina que nas últimas décadas tem mostrado um declínio no número de infectados, no entanto, continua sendo a terceira doença de maior incidência no mundo, sendo antecedida apenas pela malária e esquistossomose. Cerca de 8 milhões de pessoas por toda a América Latina são infectadas causando aproximadamente 10.000 mortes por ano. Além disso, a doença de Chagas passou a ser uma grande preocupação devido à globalização, por causa da imigração de indivíduos infectados para regiões não endêmicas, espalhando a doença para países como Austrália, Canadá, França, Alemanha, Itália, Japão, Espanha e os Estados Unidos. Atualmente, é classificada pela OMS (Organização Mundial de Saúde) como uma doença negligenciada, devido à proposta de classificação das doenças em globais (ocorrem em todo o mundo), negligenciadas (mais prevalentes nos países em desenvolvimento) e mais negligenciadas (exclusivas dos países em desenvolvimento). Essas denominações representam uma evolução do termo “doenças tropicais” por contemplar os contextos de desenvolvimento político, econômico e social (MANARIN et al., 2013; SOARES-SOBRINHO, 2009).

As tripanossomíases são mais comuns em áreas tropicais e subtropicais do mundo, mas como essas infecções parasíticas acometem muitos pacientes imunocomprometidos, são também encontradas em países desenvolvidos. Existem centenas de espécies conhecidas de triatomídeos, mas poucos têm um papel evidente na transmissão aos seres humanos, *Triatoma infestans* é uma das espécies antropofílica que participa da transmissão do parasita nos países do Cone Sul (Brasil, Chile, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia). No caso da Doença de

Chagas a causa se dá pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, onde o modo tradicional de contágio e infecção humana é através do inseto vetor, sendo estes insetos domésticos e selvagens dá subfamília Triatominae (Hemiptera e Reduviidae), vulgarmente chamado de barbeiro, outras formas de contágio é por transfusão e formas transplacentárias, além de acidentes de laboratório e transplante de órgãos infectados (GASCÓN et al., 2007; ROSAS, 2011; SCHMUNIS e YADON, 2010; SOARES-SOBRINHO, 2009).

Em áreas endêmicas, a infecção pelo *T. cruzi* tem acontecido geralmente após o contato com as fezes de triatomíneos sugadores de sangue, nessas áreas também há relatos de transmissão oral por ingestão de alimentos contaminados com fezes do inseto infectado. Com a migração maciça das zonas rurais para as zonas urbanas na América Latina, a transmissão transfusional e congênita são mais observadas onde a transmissão vetorial foi eliminada, a forma congênita pode ocorrer, quer através da transmissão transplacentária ou através do canal de parto durante o mesmo, o que pode resultar em aborto, prematuridade ou problemas no desenvolvimento dos órgãos do feto. A transmissão também é possível através de plaquetas, plasma e aglomerados de células brancas do sangue (GASCÓN et al., 2007; ROSAS, 2011).

A interiorização dos tripomastigotas de *T. cruzi* em macrófagos processa-se por fagocitose mediada por receptores da membrana plasmática da célula hospedeira. A penetração nas demais células também ocorre por um complexo processo de endocitose, que culmina na formação intracelular de um vacúolo fagocitário, no qual está contido o parasita. Os tripomastigotas transformam-se em amastigotas e somente iniciam sua multiplicação na célula após escaparem do vacúolo fagocitário e passarem ao citosol. Experiências *in vitro* mostram que, duas horas após a infecção, cerca de 70% dos parasitas já romperam a membrana do vacúolo e estão livres no citosol. Baseados no fato de que amastigotas secretam *in vitro* uma hemolisina ativa em pH 5,5 e que o pH dos vacúolos de onde se liberam esses estágios evolutivos do *T. cruzi* é normalmente abaixo de pH 6,0, os pesquisadores sugeriram que essa substância poderia estar envolvida no processo de escape dos parasitas (BRENER, 1997).

Coura e Borges-Pereira (2010) publicaram que os determinantes da doença de Chagas vêm da quantidade de parasitas na infecção inicial; número de tripomastigota (Figura 2.a); as formas que infectam inicialmente; a linhagem de *T. cruzi* inoculadas (I, II, Z3 ou híbrido I / Z3, hoje reclassificado como TCI-Tc TVI); as reinfecções; a qualidade das cepas e clones (biodemas); os receptores específicos do hospedeiro; e resposta imunitária inicial do paciente.

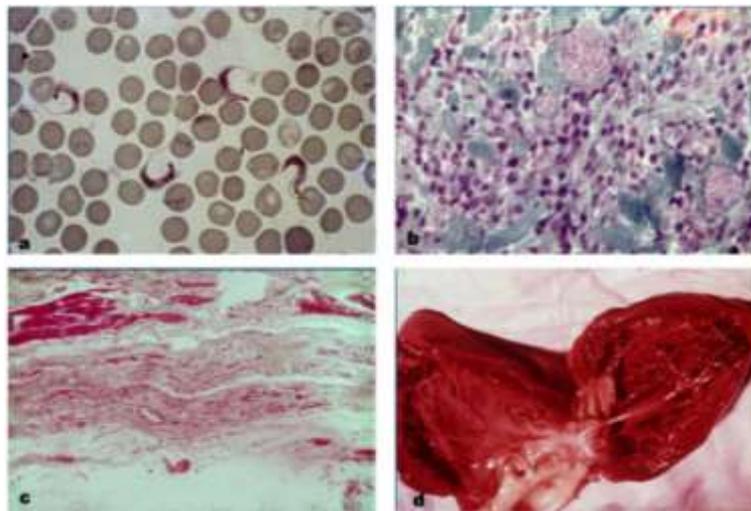
A doença quando transmitida vetorialmente tem duas fases clínicas, aguda e crônica. A fase inicial ou aguda (Figura 2.b) aparece depois de um período de incubação de uma a quatro semanas e os sintomas são evidentes em apenas 5% das pessoas infectadas, com a alta parasitemia e ausência de tratamento, os sintomas persistem durante dois a quatro meses iniciando quando o parasita entra no mamífero hospedeiro. É caracterizada por ausência de anticorpos, geralmente é assintomática, possivelmente por causa da baixa do inóculo e / ou resposta imune humoral, ou também pode apresentar sintomas inespecíficos ou menos frequentes, como miocardite ou encefalite, febre, dor de cabeça, anorexia, mal-estar, mialgia, fraqueza, náusea, vômitos, diarréia, periférica hepatomegalia, esplenomegalia ou linfadenopatia. Nesta fase os parasitas são encontrados no sangue (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

A forma cardíaca crônica é a manifestação clínica mais significativa da doença de Chagas, por causa de sua frequência e gravidade. Ela geralmente aparece entre as segunda e quarta décadas de vida, 5-15 anos após a infecção inicial. Esta é uma fase que possui duração variável, começando com o declínio da parasitemia e podendo durar por toda a vida do paciente. Pode evoluir para um problema cardíaco ou digestivo (megaesôfago ou megacólon), ou até mesmo uma associação das formas cardíacas (cardiomiopatia chagásica crônica) e digestivas, os sinais e sintomas de cardiomiopatia chagásica crônica são a arritmia, insuficiência cardíaca, bloqueios de ramo e tromboembolismo. Cerca de 40% ou 50-90% dos indivíduos infectados permanecem com os resultados dos exames radiológicos normais completamente assintomáticos e eletrocardiogramas sem anormalidades, 20-30% dos pacientes desenvolvem alterações cardíacas (forma do coração), 10% demonstram queixas digestivas (forma digestiva) ou ambos (forma mista) e menos de 5%, problemas neurológicos, os demais permanecem assintomáticos, sem manifestações clínicas durante toda a sua vida (GASCÓN et al., 2007; MANARIN et al., 2013; MANTILLA; SUÁREZ; BARRAZA, 2011; SOARES-SOBRINHO et al., 2006).

A cardiomiopatia (Figura 2.d) dá-se da seguinte maneira, os parasitas depositados sobre a pele ferida ou na mucosa estimulam uma reação inflamatória local com uma resposta linforeticular. Os tripomastigotas circulantes tomados por macrófagos são transportados para o fígado, baço, gânglios linfáticos e músculos esqueléticos e cardíacos, formando ninhos de amastigotas. Com o desmembramento dos pseudocistos no miocárdio, ocorre a miocardite aguda. Esta é mediada por células e interleucinas TCD4 + e TCD8 +, em particular IL-2 e IL-

4. A reação inflamatória conduz à destruição da célula, músculo e neurônios, e é mantida pela presença de *T. cruzi*, seus fragmentos ou por DNA do parasita, com uma reação de hipersensibilidade tardia, dilatação da microcirculação e fibrose (Figura 2.c), induzindo assim cardiomiopatia, arritmias, megaesôfago e megacólon (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

Figura 2 - a) Tripomastigotas circulantes; b) Ninhos de amastigotas de caso agudo da doença de Chagas; c) Sistemas de fibrose; d) Hipertrofia do miocárdio e dilatação com trombos no ápice ventricular na cardiopatia chagásica crônica.



Fonte: COURA e BORGES-PEREIRA, 2010.

A doença de Chagas apresenta algumas características distintivas quanto à doença cardíaca comum, dentre elas têm-se que é uma doença fibrótica, que geralmente está localizada na região posterior e apical do ventrículo esquerdo; anormalidades predominantemente segmentar da contratilidade; é uma cardiomiopatia dilatada com uma tendência para a formação de aneurismas, especialmente apical; possui grande potencial arritmogênico, com arritmias ventriculares frequentes, muitas vezes associada com bradiarritmias; apresenta alta frequência de eventos tromboembólicos; e pode ser apresentada com dor no peito, geralmente atípica embora possa ocasionalmente imitar a doença isquêmica do coração (GASCÓN et al., 2007).

O diagnóstico da doença em resumo, de acordo com a OMS, é baseado na coexistência de dois critérios, sendo o primeiro, antecedente epidemiológico compatível: o paciente apresenta pelo menos uma história epidemiológica (povos nativos ou filhos de mães provenientes de áreas endêmicas, os viajantes com estadias em área endêmica e risco de infecção) que tornou possível a transmissão do *T. cruzi* através de qualquer uma das rotas

descritas. O segundo critério é o diagnóstico microbiológico, são consideradas infectadas todas as pessoas com um resultado parasitológico positivo ou com no mínimo duas técnicas sorológicas positivas utilizando antígenos diferentes. Em caso de resultados questionáveis ou os mesmos resultados inconsistentes, uma terceira técnica deverá ser executada. Existem vários testes sorológicos para o diagnóstico da doença de Chagas utilizando diferentes técnicas (ELISA, ELISA modificada ou antígeno recombinante, imunofluorescência, hemaglutinação indireta, imunocromatografia). A reação em cadeia (PCR) é, possivelmente, a técnica mais sensível, mas a sua utilização prática não libera sorologia (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

Ações ao longo desses cem anos têm sido tomadas no combate à enfermidade. O combate existe, porém o conhecimento produzido, ainda, não se reverteu de forma efetiva em avanços terapêuticos como novos fármacos, métodos de diagnósticos e/ou vacinas. Ao enfrentar a escassez ou falta de um tratamento adequado para essas doenças, países atingidos por essas endemias têm, em sua população um custo elevado em decorrência das co-morbidades trazidas por essas doenças (BESTETTI; MARTINS; CARDINALI-NETO, 2009; MORAN et al., 2009).

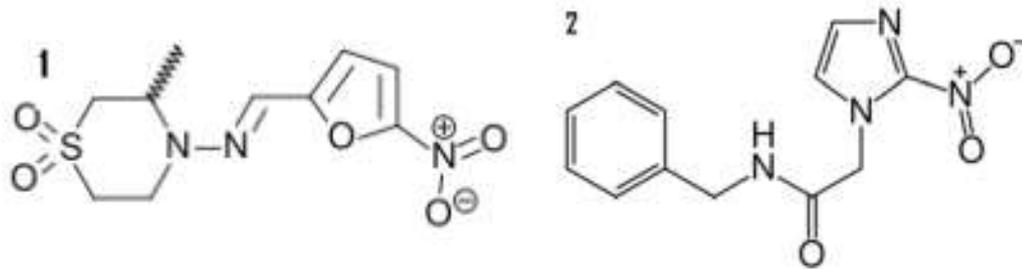
3.2 Benznidazol

O tratamento etiológico da doença de Chagas em bases racionais, só começou a ser investigado cerca de meio século depois da descoberta da moléstia, após a reunião de debates realizados no Rio de Janeiro, de 19 a 21 de março de 1962, com a participação de grande número de pesquisadores brasileiros e de representantes da indústria farmacêutica (BRENER, 2000).

Para o tratamento muitos medicamentos foram experimentados contra o *Trypanossoma cruzi*, dentre eles antibióticos, aminoquinoléínas, arsenicais entre outros, todos se mostraram insatisfatórios. Hoje, dos medicamentos encontrados no mercado para o tratamento da doença, tem-se o nifurtimox (Figura 3) cujo uso foi interrompido, por apresentar muitos efeitos secundários, permanecendo apenas o benznidazol (BNZ) (Figura 3) disponível como o fármaco de escolha, ainda com uma série de restrições, como: baixa eficácia na fase crônica da doença, alta taxa de abandono do tratamento devido aos efeitos colaterais causados pelo medicamento, longo período de tratamento (30 a 60 dias) e a inexistência de formulação pediátrica. Na utilização da dose de 5 a 7 mg/kg, 2 vezes ao dia,

durante 60 dias na fase aguda, obtêm-se 60 a 70% de curas parasitológicas, sendo como principal efeito secundário, a dermatite alérgica que pode acompanhar-se de sinais gerais (ABAD-FRANCH et al., 2009; MALTA, 1996; SOARES-SOBRINHO, 2009).

Figura 3 - 1) Nifurtimox e 2) Benznidazol.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2008.

Desde 1973, o BNZ vem sendo utilizado como o fármaco de escolha no tratamento de pacientes chagásicos, por ter o melhor perfil de eficácia, e, portanto, sendo geralmente utilizado como um tratamento de primeira linha. Ele foi desenvolvido há mais de 40 anos atrás, e está disponível como comprimidos de 100 mg. A partir de 2004, o fármaco que era patenteado pelo Laboratório Farmacêutico Suiço Roche® passou a ser de responsabilidade do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE. Daí então houve uma baixa na prioridade dos governos e indústrias farmacêuticas em financiar o desenvolvimento de formas de dosagem adequadas para tratar esta infecção (MANARIN et al., 2013; SOARES-SOBRINHO et al., 2006; TROCHINE et al., 2014).

O benznidazol, quimicamente N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, é uma importante estrutura química medicinal que mostra um largo espectro de atividade farmacológica. Um dos mecanismos de ação relatado é relacionado à redução do metabolismo do parasita, pois utiliza o NADH-dependente mitocondrial para a sua ativação como um pró-fármaco. Os dados sobre a farmacocinética do fármaco são escassos, sendo este eliminado principalmente por biotransformação no fígado, destacando-se a nitrorredução. Os estudos *in vitro* sugerem que o processo de nitrorredução esteja mediado pelo citocromo P450 e citocromo C redutase. Porém, pouco se conhece sobre as isoenzimas específicas do citocromo P450 envolvidas no metabolismo (RODRÍGUEZ-GUARDADO et al., 2011; SOARES-SOBRINHO, 2009).

Um dos maiores problemas do BNZ são os regimes de dosagem que são muito complexos tornando a resistência ao tratamento um problema crescente. Uma limitação importante desse fármaco também é a sua baixa atividade anti-parasitária na doença crônica estabelecida, que é a sua apresentação mais prevalente. Outros problemas relevantes são as grandes doses administradas, tratamentos prolongados, bem como a alta incidência de reações, o que, provavelmente, estão relacionados com a baixa solubilidade do fármaco. O benznidazol é classificado como classe II (reduzida solubilidade e alta permeabilidade) de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, sendo fracamente solúvel em água e nos fluidos aquosos, além de apresentar absorção limitada pela velocidade de dissolução e solubilidade. Há, portanto, um interesse considerável no desenvolvimento de estratégias para melhorar a taxa de dissolução do benznidazol e, eventualmente, aumento da sua biodisponibilidade (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014; TROCHINE et al., 2014).

Apesar do BNZ não ser o fármaco ideal, devido à sua toxicidade, além da baixa solubilidade em água, o uso de alternativas tecnológicas, como a obtenção de complexo de inclusão com as ciclodextrinas, têm sido particularmente usados devido às suas propriedades complexantes, aumento da solubilidade, dissolução dos fármacos pouco solúveis e conseqüentemente melhora da sua biodisponibilidade. Outra técnica utilizada pelos pesquisadores na área da tecnologia farmacêutica é a obtenção de dispersões sólidas, utilizando carreadores solúveis em água, como os polímeros hidrofílicos, o polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG), que têm sido largamente empregados nestes sistemas devido aos seus baixos custos e alta solubilidade em água (SOARES-SOBRINHO, 2009).

Neste direcionamento, Lamas et al. (2006) delineou lipossomas que carregam o benznidazol com a finalidade de desenvolver uma forma farmacêutica que permitisse superar a baixa solubilidade do BNZ em meio aquoso. Desse modo, seria possível aumentar a seletividade e reduzir a toxicidade do fármaco, contudo o método carrega como desvantagem a necessidade da administração por via endovenosa, o que representa um incômodo em tratamentos diários e prolongados. Outra desvantagem está relacionada com a viabilidade comercial de tal forma farmacêutica, uma vez que seu custo é consideravelmente mais elevado. Por se tratar de um medicamento destinado a uma doença negligenciada, o custo do produto final está relacionado com o acesso da população a esta alternativa terapêutica.

Outra estratégia para melhoria da eficácia biológica de fármacos é a obtenção de complexos de metais com ligantes ativos. Ligação a macromoléculas, incluindo ADN e

proteínas covalentes também tem sido demonstrada para BNZ, é necessário apenas experiências adicionais para revelar o papel de cada uma das proteínas, e também confirmar as interações fármaco-proteína (SOARES-SOBRINHO, 2009; TROCHINE et al., 2014).

Devido aos problemas ainda existentes uma série de pesquisas vem sendo desenvolvidas em torno de novas alternativas tecnológicas, como a obtenção de complexo de inclusão, dispersões sólidas, multiparticulados e sistemas de liberação prolongada, a fim de aumentar a biodisponibilidade do BNZ e assim diminuir o aporte de fármaco administrado aos pacientes (LIMA, 2008; LYRA, 2009).

3.3 Excipientes

O termo vem da palavra latina excipiens, que significa receber, para reunir, para tirar. Este se refere a uma das propriedades de um excipiente, que é o de assegurar que um medicamento tem o peso, consistência e volume necessário para a administração correta de um princípio ativo ao paciente. Em 1957, os excipientes foram definidos como “a substância utilizada como um meio para dar um medicamento”, isto é, simplesmente com as funções de um suporte inerte ao princípio ativo. O mesmo era intencionalmente adicionado a uma formulação somente para melhorar o tratamento e uniformidade de dosagem, para proporcionar estabilidade ao fármaco e melhorar o sabor ou aparência, outros excipientes eram essenciais para o processo de fabrico, enquanto outros contribuíam para a liberação do fármaco a partir da forma de dosagem de modo que a disponibilidade do fármaco não fosse prejudicada pela incorporação do fármaco numa forma de dosagem sólida (GARCÍA-ARIETA, 2014; PIFFERI e RESTANI, 2003).

Porém nos últimos anos tem sido conhecido que os excipientes não são necessariamente um componente farmacologicamente inerte. Excipientes farmacêuticos têm desempenhado um papel importante nas preparações, não só fornecendo forma de dosagem de fármacos, mas também impacto significativo sobre a sua biodisponibilidade, toxicidade, estabilidade e eficácia. Portanto, é de grande importância explorar e desenvolver novos excipientes para que a qualidade destes seja melhorada. Tradicionalmente, os fármacos com baixa solubilidade têm exigido excipientes como surfactantes ou agentes umectantes para facilitar ou acelerar liberação do fármaco e dissolução, que é o passo anterior essencial para a absorção do fármaco. Estes excipientes contribuem “ativamente” melhorando o perfil de

libertação do princípio ativo e a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade, entendida como a velocidade e quantidade de princípio ativo libertado a partir da forma farmacêutica e a penetração na circulação sistêmica (ZHENHAO et al., 2011).

Portanto, a qualidade de um fármaco não depende apenas das características das substâncias ativas e o processo de produção, mas também, em parte, da qualidade dos excipientes, sendo este não mais considerado um produto inerte, mas um componente essencial e funcional. Em geral, este último contribui notavelmente para o desempenho do fármaco, ao contrário do que se acreditava no passado, é fundamental para garantir a segurança e eficácia do produto farmacêutico final (PIFFERI; SANTORO; PEDRANI, 1999).

Recentemente, novas tecnologias de fabricação de excipientes são necessárias para melhorar a libertação, dissolução e absorção de fármacos de baixa solubilidade. A tecnologia farmacêutica moderna também requer a verificação do estado físico do excipiente, que é tão importante tanto na fase de fabrico como no controle da libertação do princípio ativo, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade e, por conseguinte, a eficácia e tolerabilidade do fármaco (GARCÍA-ARIETA, 2014).

A incorporação de fármacos em partículas poliméricas biodegradáveis é um dos muitos processos que aumentam significativamente e controladamente a liberação de fármacos, bem como os protegem de degradação precoce. A incorporação de múltiplos fármacos em micro e nanocápsulas têm atraído grande interesse para aplicações biomédicas, uma vez que pode induzir efeitos terapêuticos sinérgicos. Um método utilizado é o aprisionamento por difusão fickniana, em que o princípio ativo, inicialmente, é dissolvido num solvente adequado, e, posteriormente, o material hospedeiro é adicionado ao sistema, de modo que o processo de difusão ocorra. Após o tempo estabelecido por este processo, o sistema é centrifugado, o sobrenadante utilizado para a análise desejado, e, finalmente, o material é submetido a secagem. Recentemente, alguns autores utilizando este método de incorporação, demonstraram a eficácia de incorporação do fármaco ibuprofeno em materiais orgânicos metálicos MIL-100, MIL-110, MIL-53 (Cr) e MIL-53 (Fe) (ALVES, 2013).

O sucesso na incorporação de fármacos está atrelado a uma análise prévia e atenciosa do material hospedeiro. Este deve ser selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar o sistema material/fármaco. Em adição, é interessante que o encapsulante apresente baixa viscosidade em concentrações elevadas e seja de fácil manipulação durante o processo; possua baixa

higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; seja reativo com o material a ser encapsulado; tenha habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; libere completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcione máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; seja solúvel em solventes comumente usados; possua as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não apresente sabor desagradável no caso de consumo oral; e seja econômico (ALVES, 2013).

3.4 Liberação prolongada

Os medicamentos são utilizados com finalidade profilática, terapêutica ou diagnóstica. Contêm uma (ou mais) substância (s) ativa (s) que deve (m) ser administrada (s) ao paciente através de uma das vias possíveis, veiculadas em uma forma farmacêutica (FF) sólida, semi-sólida ou líquida. As FF sólidas de uso oral (FFSO) são as mais usadas, após a administração de uma FFSO, o fármaco deve ser liberado e se dissolver nos fluidos gastrintestinais para que seja absorvido e exerça a ação farmacológica esperada. As FFSO podem ser classificadas, de acordo com o tipo de liberação do fármaco, em produtos com liberação convencional ou modificada, as de liberação convencional (ou pronta liberação ou liberação imediata) são desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração, sendo empregados nesses sistemas diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favorecem os processos de liberação e dissolução do fármaco. Porém, desde as últimas décadas, uma atenção considerável esteve voltada para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de fármacos, principalmente, porque a utilização da maioria dos compostos terapêuticos é sempre limitada pela impossibilidade de aumento de dosagem. As FFSO de liberação modificada são concebidas para modularem a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução, os objetivos podem ser: tornar a FF gastrorresistente, prolongar o efeito farmacológico, liberar o fármaco em um sítio específico do trato gastrintestinal (TGI) ou após um período definido de tempo (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Os primeiros estudos, que datam do início do século XX, realizados para a obtenção de sistemas carreadores eficazes tiveram como base o encapsulamento de moléculas quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido por “Bala Mágica de Ehrlich” (Ehrlich’s

Magic Bullet). Hoje, seguindo a mesma idéia, existem sistemas carreadores, como lipossomas, niossomas, aquassomas, transferssomas, nanocápsulas, microcápsulas, ciclodextrinas, microesponjas, entre outros. Os dispositivos são frequentemente feitos sob medida e desenvolvidos tão cuidadosamente, quanto o fármaco que eles pretendem conter (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

Tecnologia de entrega controlada de fármaco proporciona algumas vantagens sobre as formas de dosagem convencionais, devido ao fato de tais sistemas de fornecimento apresentar uma maior segurança, eficiência, toxicidade reduzida, e a adesão e conveniência ao paciente, por manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um período prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. Nestes sistemas, o fármaco está ligado a um transportador (carreador), que é o responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, melhorando, desta forma, a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) dos mesmos (BARZEGAR-JALALI et al., 2012; PETITTI; VANNI; BARRESI, 2008; RODRIGUES, 2006).

Uma ampla variedade de sistemas carreadores de fármacos tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica, designados para controlar a exposição do fármaco, ao longo do tempo; diminuir ou até mesmo acabar com os picos plasmáticos; auxiliar a passagem do fármaco pelas barreiras fisiológicas; proteger o fármaco da sua rápida eliminação; destinar o fármaco para o local de ação, evitando que o mesmo atinja outras partes do corpo; e aumentar a adesão do paciente, por reduzir a frequência de administração. Entre estes incluem sistemas poliméricos, que podem atuar através de três mecanismos primários: difusão, erosão e sistemas ativados por solventes. Vale salientar que estes eventos podem ocorrer associadamente. Na difusão, o fármaco encapsulado por uma membrana polimérica ou suspenso numa matriz polimérica, se dissolve e se difunde para fora do polímero. Na erosão, como no método de difusão, o fármaco é contido na membrana ou matriz polimérica, o polímero é degradado naturalmente, liberando então o fármaco. Nos sistemas ativados por solvente são utilizadas membranas semipermeáveis, contendo um pequeno orifício e uma alta concentração de um fármaco, causando a entrada da água (fluidos biológicos) pela membrana, dessa maneira forçando a saída do fármaco pelo orifício por causa do aumento de pressão interna (ALVES, 2013; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

A taxa de dissolução do fármaco pode ser controlada através de diferentes dispositivos, tais como:

3.4.1 Sistemas matriciais

As matrizes são dispersões ou soluções de um fármaco em uma ou mais substâncias capazes de modular a sua liberação, geralmente polímeros de natureza hidrofílica ou inerte. Essas matrizes podem ser elaboradas sob as formas de comprimidos, cápsulas gelatinosas, grânulos, pellets ou minicomprimidos, nos sistemas matriciais, a liberação do fármaco pode envolver processos de intumescimento do polímero, difusão do fármaco e erosão da matriz. Em alguns casos, o fármaco pode estar ligado quimicamente à cadeia polimérica e ser liberado pela quebra hidrolítica ou enzimática dessa ligação. Um ou mais desses processos podem regular a liberação em uma mesma FFSO, dependendo do tipo de polímero empregado e das propriedades físico-químicas do fármaco. Nas matrizes insolúveis, constituídas por ceras (nesse caso, também denominadas matrizes hidrofóbicas) ou polímeros insolúveis em água (nesse caso, também denominadas matrizes inertes), o fármaco é liberado essencialmente por difusão (para matrizes hidrofóbicas, pode haver um mecanismo de erosão associado). Em decorrência de sua insolubilidade, a matriz ou parte dela pode ser eliminada nas fezes, mas isso não significa que não houve liberação total do fármaco no trato gastrointestinal (TGI). Nas matrizes hidrofílicas, a solubilidade do fármaco pode ser um fator essencial, capaz de influenciar o comportamento do sistema e os processos de liberação do mesmo. Fármacos com elevada solubilidade tendem a ser liberados por difusão, enquanto fármacos pouco solúveis são liberados, predominantemente, através do fenômeno de erosão. Portanto, a baixa solubilidade do fármaco favorece a presença de partículas sólidas na camada de gel, diminuindo a motilidade e a resistência da mesma, tornando-a mais susceptível ao processo de desestruturação. Quando a FF entra em contato com os fluidos gastrintestinais, o polímero na sua superfície é hidratado e intumescce, formando uma camada gelificada, a camada gelificada é posteriormente dissolvida, promovendo a erosão do comprimido. Outras camadas de gel são formadas e dissolvidas sucessivamente na superfície da FF e o fármaco é liberado por difusão através dessas camadas gelificadas e/ou erosão da matriz (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; STEINGRÄBER; SHTOLTZ; RODRIGUES, 2008).

3.4.2 Sistemas reservatório

Nestes sistemas, um reservatório (núcleo) contendo o fármaco é revestido por uma membrana polimérica. O núcleo pode ser um comprimido, um grânulo, um pellet ou um minicomprimido. O fármaco é liberado por difusão através da membrana de revestimento, que pode ser microporosa ou não apresentar poros. Quando uma membrana não-porosa é utilizada, a liberação é governada pela difusão da substância ativa através do polímero e, assim, pode ser modulada pela seleção de um polímero no qual ela apresente a difusividade adequada. No caso de membranas microporosas, a difusão do fármaco no meio que estiver preenchendo os poros (em FFSO, fluidos gastrintestinais) determinará o processo de liberação. Outra forma de se obter liberação prolongada mediante o uso de um sistema de reservatório é preparar uma FFSO que contenha camadas alternadas de ativo e de um polímero hidrossolúvel. O fármaco será liberado gradualmente à medida que cada camada de polímero dissolver, sendo que a velocidade do processo estará condicionada pela velocidade de dissolução do filme polimérico e dependerá da sua espessura e do tipo de polímero empregado (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

3.4.3 Bombas osmóticas

Bombas osmóticas são sistemas que utilizam pressão osmótica para modular a liberação do fármaco. A FF é constituída por um núcleo (comprimido, cápsula gelatinosa dura ou mole) revestido com uma membrana semipermeável, que possui um orifício feito a laser. O núcleo contém um agente osmótico, que pode ser a substância ativa ou outro material. Após a administração da FF, o solvente penetra no núcleo (atraído pelo agente osmótico), aumentando a pressão interna, o que resulta na liberação do fármaco dissolvido ou disperso, através do orifício na membrana. Alguns sistemas osmóticos possuem dois compartimentos: um contém a substância ativa e outro um polímero hidrofílico (agente osmótico). Quando o solvente penetra na FF, o polímero é hidratado e intumescce, impulsionando o fármaco junto com o solvente para fora, através do orifício no revestimento, esses sistemas são chamados de “pushpull” (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Essas formas farmacêuticas de liberação controlada apesar de possuir inúmeras vantagens possuem algumas limitações como: restrições para fármacos muito potentes com

baixo tempo de meia-vida, com dificuldade de absorção no trato gastrointestinal; impossibilidade de interrupção do efeito terapêutico imediato em caso de intoxicação ou intolerância; risco de acumulação do fármaco com velocidade de eliminação lenta e dificuldade de adaptação da posologia às diferentes farmacocinéticas interindividuais. Em termos gerais, os fármacos que mais se adaptam a estes sistemas possuem as seguintes características: velocidades médias de absorção e excreção; absorção uniforme no trato gastrointestinal; absorção em doses relativamente pequenas; margem de segurança relativamente larga; utilização no tratamento de doenças crônicas em vez de agudas (LYRA et al., 2007).

3.5 Materiais porosos

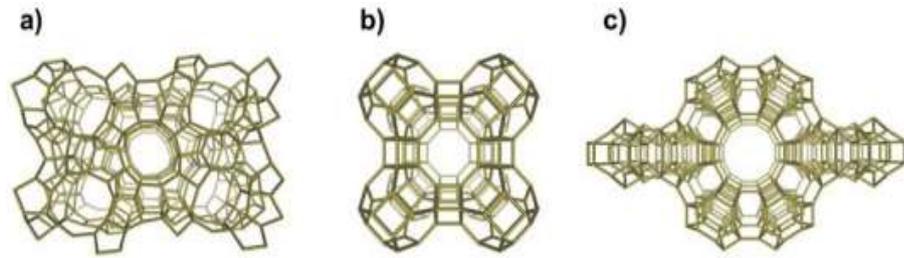
O grande interesse científico nos materiais porosos deve-se a sua ampla aplicabilidade nos setores da saúde e tecnologia tais como: separações químicas, troca iônica, sensores, carreadores de fármaco, entre outros. Esses materiais são divididos em três classes, sendo eles denominados materiais porosos inorgânicos, materiais à base de carbono e polímeros de coordenação (CUNHA, 2009).

Materiais porosos são classificados segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) baseados em seus tamanhos de poros, d : microporosos para $d < 20 \text{ \AA}$, mesoporosos para $\text{\AA} \leq d \leq 500 \text{ \AA}$, e macroporosos para $d > 500 \text{ \AA}$. Recentemente há referências a materiais nanoporosos para estruturas que tem poros entre 10 – 100 \AA de diâmetro (YAGHI; O'KEEFFE; KANATZIDIS, 2000).

Até metade dos anos 90, havia basicamente dois tipos de materiais porosos, chamados, inorgânicos e materiais baseados em carbono. No caso dos sólidos inorgânicos podemos citar as zeólitas, as quais pertencem à classe dos aluminossilicatos microporosos, estruturalmente bem definidos, sendo usados essencialmente como catalisadores ácidos na isomerização, alquilação e quebra de hidrocarbonetos na indústria de petróleo, na fabricação de detergentes e mais recentemente foram propostos como carreadores de fármacos (CUNHA, 2009).

As zeólitas consistem em estruturas 3D cristalinas (Figura 4). Suas redes, construídas a partir de tetraedros com os átomos silício ou alumínio nos centros e os de oxigênio em cada vértice, TO_4 (T=Al, Si) define túneis interconectados ou cavidades (TAO et al., 2006).

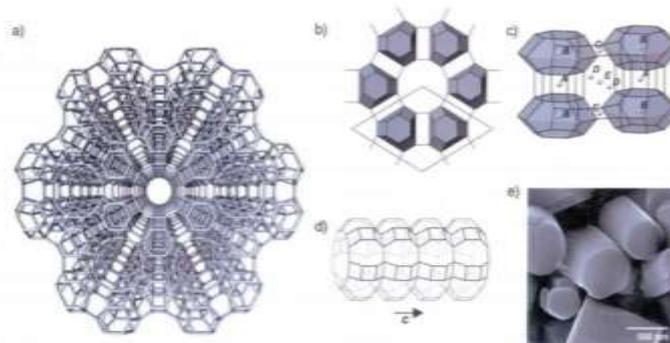
Figura 4 - Três exemplos de redes zeólitas: a) Contendo um sistema de canais bidimensionais; b) Contendo cavidades; c) Contendo um sistema de canais unidimensionais.



Fonte: CUNHA, 2009.

Esses aluminossilicatos são geralmente sintetizados por via hidrotermal sob meio alcalino, a temperatura entre cerca de 80° e 200° C e são termicamente estáveis. Entretanto, o grande inconveniente das zeólitas é que a pequena dimensão dos canais (inferior a 0,8 nm) e cavidades (geralmente <1,5 nm) impõe limitações de tamanho e forma das moléculas hóspedes (Figura 5) (CUNDY e COX, 2003).

Figura 5 - Zeólitas a) Projeção ao longo do eixo-c mostrando 7 canais; b) Projeção ao longo do eixo-c mostrando células unitárias em forma de poliedro; c) Secção mostrando as diferentes posições catiônicas; d) Visão de anéis formando canais ao longo do eixo c; e) Imagem de microscopia eletônica de varredura de cristais de zeólita.



Fonte: CUNHA, 2009.

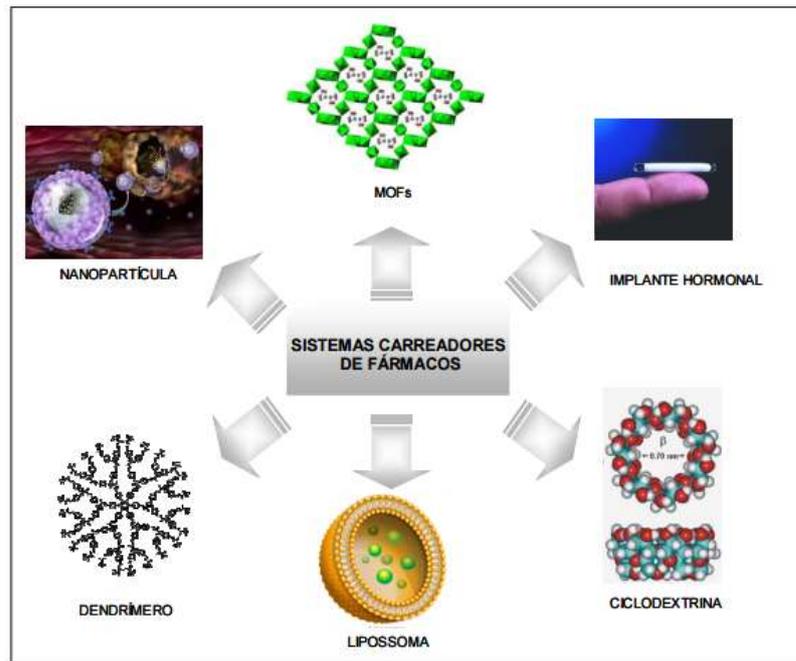
Alguns esforços foram dedicados ao desenvolvimento de zeólitas com poros grandes (>1,5 nm), mas os aumentos foram modestos. Além disso, estes novos materiais não são muito eficazes na incorporação de moléculas grandes impossibilitando, desta maneira, o design e a síntese de novas zeólitas que possam ser utilizadas como carreadores de uma grande variedade de fármacos. Em contrapartida, as redes de coordenação podem ser idealizadas e sintetizadas

com diferentes tamanhos de poros objetivando incorporar diferentes fármacos obtendo-se assim um carreador multifuncional (CUNHA, 2009).

3.6 *Metal Organic Framework* (MOF)

Atualmente a busca por tratamentos de antigas e novas doenças continua e novas tecnologias têm sido desenvolvidas para melhorar o transporte e as propriedades de fármacos não só para o tratamento da doença de Chagas, mas de outras patologias, como exemplo destas tecnologias se tem, pró-fármacos, lipossomas, biopolímeros, nanopartículas, ciclodesxtrinas e recentemente redes de coordenação ou *Metal Organic Frameworks* (MOF's) (Figura 6). Além da proposta de melhorar a biodisponibilidade de moléculas utilizadas nos tratamentos de diversas doenças, esses sistemas têm como principal objetivo o de diminuir efeitos tóxicos de fármacos já utilizados e com isso melhorar a qualidade de vida das pessoas que necessitam desses tratamentos. Vale salientar, que essas novas tecnologias são o esforço de anos de pesquisas em diversas áreas tais como biologia, química, engenharia de materiais e física, sendo o fruto de trabalhos interdisciplinares originando os sistemas supracitados conhecidos como carreadores de fármacos (CUNHA, 2009).

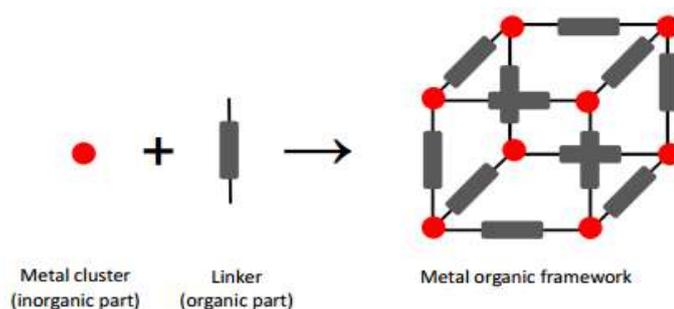
Figura 6 - Alguns sistemas utilizados como carreadores de fármacos.



Fonte: CUNHA, 2009.

MOF's são uma classe de materiais cristalinos, um critério importante para o estabelecimento preciso de relações entre estrutura e propriedades, e híbridos altamente porosos compostos por nós de metal ou óxido de metal conectados fortemente por ligantes orgânicos compostos (Figura 7), oferecendo assim propriedades químicas únicas com uma porosidade interna permanente, esses ligantes permitem um grande número de possíveis estruturas, com diferentes funcionalidades químicas. Os materiais orgânicos (tais como carboxilatos, imidazolatos, ou fosfonatos) na estrutura híbrida da MOF proporcionam biocompatibilidade e a capacidade de uma grande quantidade de absorção de fármacos, enquanto que os grupos inorgânicos podem ser otimizados para liberação controlada. Essas estruturas adsorventes de baixa densidade ($0,2-1\text{g/cm}^3$) tem sido submetidas a investigação intensa sobre a sua utilização em processos de catálise, magnetismo, luminescência, sensores, como material de armazenamento e entrega de fármacos e no armazenamento de gás, estas propriedades e utilidades da MOF dependem da sua forma e tamanho de poro, das superfícies internas e externas, e dos grupos funcionais (KANG et al., 2014; KESKIN e KIZILEL, 2010; LEE; WU; LI, 2012; LEI et al., 2014; SIKORA et al., 2014).

Figura 7 - Representação esquemática que mostra a construção da MOF.



Fonte: SHAHID, 2015.

Apesar de terem sido conhecidas desde 1965, o interesse se acendeu no final de 1999, quando MOF's foram sintetizadas com base no conceito de desenho reticular. A combinação de várias características e número infinito de possíveis estruturas de MOF's tornou estes atraentes aos materiais nanoporosos tradicionais em muitos campos científicos e industriais. Ao longo dos últimos oito anos, foram investigadas para aplicações em carregamento e liberação de vários fármacos, tendo como objetivo conceber transportadores que apresentem pouca toxicidade no organismo e biocompatibilidade tanto do metal de transição como do ligando. A conectividade de rede das unidades de construção é o que determina em grande parte as propriedades de uma MOF, características vantajosas como cristalinidade bem definida, áreas de superfície excepcionalmente elevadas (500-4500 m²/g) e grandes dimensões dos poros, elevada estabilidade térmica e química, biodegradabilidade intrínseca como resultado de ligações de metais relativamente lábeis e versáteis são desejáveis quando o intuito é o transporte de moléculas (ROWSELL e YAGHI, 2004).

Essas estruturas orgânicas metálicas também podem ser classificadas como flexível ou rígida. As rígidas possuem porosidade permanente e estruturas porosas robustas semelhantes aos materiais porosos inorgânicos, já as flexíveis possuem dinâmica e respondem aos fatores externos, como moléculas hóspedes, temperatura e pressão. Flexibilidade estrutural, também conhecida como a "respiração", permite que essas MOF's possam modular reversivelmente o seu tamanho de poro de acordo com as moléculas hóspedes adsorvidas nestes. Outro tipo de classificação quanto a sua estrutura é onde são chamadas de concatenada, interpenetrante, ou entrelaçadas. Em concatenação, duas ou mais estruturas são idênticas, intercrescidas em detrimento do volume do poro. Nas MOF's interpenetradas, as redes são deslocadas exageradamente uma da outra, enquanto que na MOF entrelaçada são minimamente deslocadas

e mostram um contato estreito, o que pode resultar no reforço mútuo (KESKIN e KIZILEL, 2010).

Tais materiais geralmente são sintetizados por meio de técnicas hidrotermais ou solvotérmica em que cristais crescem lentamente a partir de uma solução quente com metais precursores. Uma questão importante é a ativação da MOF após a síntese, pois solventes utilizados durante a mesma geralmente permanecem nos poros dos materiais, e, a ativação por aquecimento é necessário para remover estas moléculas de solvente, porém, a ativação a temperaturas elevadas pode causar decomposição, enquanto que a ativação a temperaturas mais baixas reduz grandemente o perigo de reduzir íons metálicos (ROSSEINSKY, 2004).

Além de propriedades como controlar a libertação e evitar o "efeito de rebentamento", o controle da degradação da matriz, a engenharia da sua superfície e a eficiência em prender fármacos, outra propriedade de MOF's que deve ser levada em consideração é a toxicologia pelo fato desta conter íons de metais de transição. Toxicologia de materiais é de suma importância, especificamente quando esses materiais são utilizados na saúde, no setor biomédico, ou em aplicações biológicas. Alguns metais são conhecidos por serem altamente tóxicos ainda que existam em quantidades apreciáveis no corpo, por exemplo, a hemoglobina contém ferro, que é cerca de 22 μm do sangue, ao passo que outros, tais como cobre (68 μm), manganês (180 μm), zinco (180 μm), e níquel (2 μm) são encontrados no tecido. Uma vez que esta é uma classe emergente de carreadores de fármacos, há poucos dados sobre o destino biológico destes sistemas. É importante notar que os estudos de toxicologia de MOF's começaram recentemente e os realizados até agora, especificamente em materiais carboxilato são animadores (KESKIN e KIZILEL, 2010).

O primeiro grupo de MOF's a ser investigado como um sistema de entrega de fármacos foi o da família MIL (Materiais do Instituto Lavoisier) por Fe'rey e colegas de trabalho, essa família é desenvolvida a partir de centros de metal trivalente e ácidos carboxílicos como ponte ligante e foi uma grande promessa devido as suas características atraentes: poros grandes (25-34 Å), áreas de superfície em circulação (3100-5900 m^2/g), e a capacidade de incorporar grupos funcionais na estrutura, por meio de interações não covalentes (HUXFORD; ROCCA; LIN, 2010).

Um dos trabalhos iniciais tratou de incorporar o fármaco ibuprofeno, na intenção de estudar a interação do mesmo com diferentes MOF's, Horcajada e colaboradores (2006), estudaram MOF's de cromo, a MIL-100 e a MIL-101, nesse trabalho foi observado que houve

diferença na adsorção do referido fármaco, devido a diferença nos tamanhos dos poros, resultado da presença de ligantes diferentes nas redes. Nos trabalhos seguintes, foram utilizadas mais duas MOF's, MIL-53 (Cr) e MIL-53 (Fe) para adsorção e liberação controlada *in vitro* do ibuprofeno. Os resultados obtidos indicaram que a quantidade de fármaco inserida na rede foi a mesma, indicando que o metal utilizado em cada rede híbrida não influenciou a adsorção do fármaco, já que as duas MOF's são formadas pelo mesmo ligante, variando apenas o metal (ALVES, 2013).

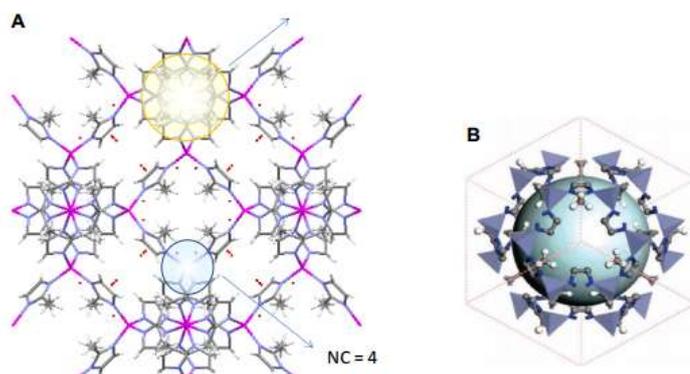
3.7 Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF-8)

Quadros zeolítico-imidazolato (ZIF's) são uma subclasse de MOF's, em que cátions de metais bivalentes são ligados por ânions imidazolato em estruturas tetraédricas. Os zeólitos possuem propriedades estruturais atraentes e grande potencial para aplicações em armazenamento de produtos químicos, encapsulamento químico e entrega controlada de fármacos, detecção química e separações químicas, incluindo separações com base em membranas, tudo devido à sua estrutura rígida, áreas de superfície adequadas com alta estabilidade aquosa (GADIPELLI et al., 2014; HE et al., 2014; KARAGIARIDI et al., 2012; KWON e JEONG, 2014; PAPPORELLO; MIRÓ; ZAMARO, 2015; YAO et al., 2013; YIN et al., 2014).

Pouco mais de 100 estruturas distintas de ZIF haviam sido notificados até 2010, em comparação com mais de 190 zeólitos conhecidos. Um exemplo é a ZIF-8, estrutura topologicamente isomorfa com zeólitas, que foi originalmente sintetizada como microcristais por Yagui e colaboradores utilizando dimetilformamida (DMF) e sendo hoje uma das estruturas mais estudadas, composta por cátions de Zn^{2+} interligados com ligantes de 2 metil imidazolato, formando estruturas com grandes cavidades de 11,6 Å (Figura 8) e pequenas aberturas dos poros de 3,4 µm, tornando capaz o seu uso como uma peneira molecular. Por sua estrutura ser flexível, permite a entrada de moléculas maiores que o tamanho da sua janela. ZIF's têm atraído recentemente grande atenção devido à sua maior área de superfície (1300-1600 m²/g), sua densidade baixa intrinsecamente, aberturas dos poros em escala molecular combinada com alta microporosidade, diversidade estrutural e química, elevada estabilidade térmica até quase 400 °C e estabilidade frente à umidade em comparação com outras estruturas de MOF. Devido à sua grande área superficial, espera-se que as nanopartículas ZIF-8 resultem em melhor contato

com a matriz do polímero e na redução de vazios interfaciais (AMIRILARGANI e SADATNIA, 2014; BUSTAMANTE; FERNÁNDEZ; ZAMARO, 2014; FANG et al., 2014; MELGAR et al., 2014; ORDOÑEZ, 2010; ZHANG et al., 2012).

Figura 8 – a) Estrutura cristalográfica da ZIF-8, ilustrando o sítio de coordenação do íon Zn^{+2} (NC= número de coordenação) e b) Estrutura ilustrando a cavidade da ZIF-8.



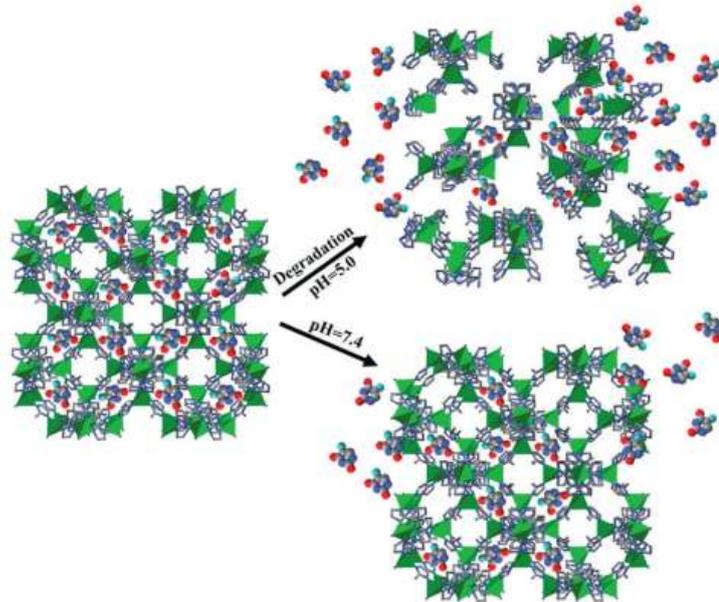
Fonte: ALVES, 2013.

Identificação e modificação das condições de síntese são importantes para permitir a construção desejável do conjunto de unidades. Portanto, a seleção adequada de sal inorgânico, ligantes orgânicos e solventes, em síntese de ZIF-8, por exemplo, tempo de síntese, a concentração (proporções molares) e pH da solução de síntese pode produzir ZIF-8 com elevada cristalinidade e porosidade, bem como forma e funcionalidade desejável. Algum grau de forma e tamanho pode ser alcançado através de vários métodos, têm sido relatado para sintetizar rapidamente ZIF-8 temperatura, mistura direta, microondas e ultra-som (ANI, 2013).

Estudos anteriores mostraram que ZIF-8 possui estabilidade aquosa e quando suspensa em solução ácida, se decompõe rapidamente. Estes resultados inspirou a exploração da mesma como transportadora de fármacos pH-responsivas. Assim, sugere-se que essa ZIF possua uma propriedade de dissolução sensível ao pH que pode ser utilizada como um veículo de entrega de fármacos liberando sua carga útil em condições moderadamente ácidas de maneira controlada. Recentemente, testes realizados com o fármaco fluorouracil, mostrou que a ZIF-8 é estável em condições orgânicas importantes, com valores de pH diferentes, assim, tanto em ambientes neutro, ou ácido atua como um veículo eficiente de fármacos (Figura 9). Existem outros estudos em que foi alcançando efeitos semelhantes, onde a cafeína foi encapsulada na ZIF-8 por métodos *in situ* e *ex situ* de encapsulação, o que demonstrou as vantagens quanto à

quantidade encapsulada, bem como o seu tempo de sustentação. Apesar das pesquisas citadas, existe uma necessidade de utilizar a ZIF-8 de uma forma mais eficaz e inovadora, impondo mais credibilidade como um veículo eficiente de fármacos ou substâncias bioativas (SUN et al., 2012).

Figura 9 - Ilustração esquemática mostrando duas abordagens do encapsulado 5-Fluorouracil libertado da ZIF-8.



Fonte: SUN et al., 2012.

3.8 Caracterização de materiais farmacêuticos

O conhecimento das características físico-químicas de uma matéria-prima farmacêutica cumpre papel significativo na antecipação de problemas de formulação, além de auxiliar na identificação de rotas viáveis na tecnologia de obtenção de medicamentos (ARAÚJO, 2003; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; RODRIGUES et al., 2005).

Vieira e colaboradores (2013) evidenciam em seus estudos a importância da identificação e caracterização físico-química de novas entidades químicas, além de estudos que norteiem sobre sua estabilidade. Onde a partir destes, é possível estabelecer um padrão de identificação da molécula para que posteriormente seja possível sua intervenção tecnológica de forma racional e assim garantir a sua qualidade.

Os métodos que têm sido utilizados para caracterização de sólidos são: difratometria de raios-x (DR-X), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de área superficial específica (método BET), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e ultravioleta (UV). Uma outra técnica que pode ajudar na corroboração dos resultados é a microscopia de luz polarizada.

3.8.1 Difratometria de Raios-X (DR-X)

Entre as várias técnicas experimentais disponíveis para a identificação de formas sólidas, incluindo polimorfos, solvatos, sais, co-cristais e formas amorfas, a difração de raios-X (DR-X) se destaca no estudo destas formas farmacêuticas. DR-X é baseada na lei de Bragg, em que o padrão de difração apresenta uma série de reflexões, as quais são identificadas no difratograma pelo ângulo (2θ) ou pela distância interplanar (d) contra a sua intensidade. Estando este padrão relacionado com a composição química e com o ordenamento cristalino das moléculas no cristal (CUFFINI et al., 2007; SYKULA-ZAJA et al., 2011).

Macromoléculas e polímeros podem formar cristais da mesma forma que compostos inorgânicos e minerais, com cujas estruturas cristalinas estamos mais familiarizados. No princípio da difração de raios-x muitas funções nas análises farmacêuticas são assumidas, sendo esta uma poderosa ferramenta que permite alta precisão nos resultados quantitativos e qualitativos de misturas sólidas. Essa técnica utiliza o espalhamento coerente da radiação X, por estruturas organizadas (cristais), permitindo realizar estudos morfológicos em materiais, determinando sua estrutura cristalina e sua fração (percentual) cristalina. O feixe é aplicado na amostra, e bandas de interferência podem ser detectadas, o ângulo cujas bandas de interferências podem ser detectadas depende do comprimento de onda aplicado e da geometria da amostra com respeito a periodicidades na estrutura. A cristalinidade na amostra é refletida por uma região característica denominada *fingerprint* (impressão digital) na difração do padrão, devido à especificidade do *fingerprint*, a cristalinidade no fármaco pode ser identificada separadamente pela cristalinidade do carreador. Além disso, essa técnica combina especificidade com um alto nível de exatidão para a caracterização dos fármacos sólidos e é um método especialmente útil para descrever o possível comportamento polimórfico de fármacos.

Igualmente permite a identificação simultânea de ingredientes ativos múltiplos em formulações farmacêuticas diferentes (CANEVAROLO-JÚNIOR et al., 2003).

3.8.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética é composta de um vetor campo elétrico e um vetor campo magnético, mutuamente ortogonal, que se propagam em uma dada direção, apresentando a dualidade onda-partícula, onde a natureza ondulatória manifesta-se por meio da interferência, dispersão, polarização e coerência da radiação eletromagnética. A natureza corpuscular manifesta-se por meio do efeito Compton e do efeito fotoelétrico (ALVES, 2013).

Define-se espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) como a medida da absorção, por parte de compostos químicos analisados, de uma radiação eletromagnética em que o comprimento de onda se situa na faixa de 10^{-4} a 10^{-2} cm, sendo este espectro único para cada substância com exceção aos isômeros ópticos que em solução apresentam espectros idênticos (KOROLKOVAS, 1984).

A região espectro magnética correspondente ao infravermelho causam alterações no estado de energia vibracional da molécula. As transições vibracionais são associadas a mudanças na rotação dos átomos sobre ligações químicas, que por sua vez, podem ser formadas por diferentes combinações entre átomos ou números de elétrons compartilhados. Mudanças estruturais e ausência de estrutura cristalina podem levar a mudanças nas ligações entre grupos funcionais que podem ser detectados por espectroscopia de infravermelho. Consequentemente, cada pico num espectro de infravermelho corresponde a um grupo funcional particular, eventos como desaparecimento, surgimento ou deslocamento de bandas características fornecem indicativos de interações entre o fármaco e outras substâncias (GIL et al., 2007).

No setor farmacêutico, a espectroscopia de infravermelho é usada em inúmeras aplicações, como identificação de fármacos, caracterização de grupos funcionais típicos de determinado material, avaliação da pureza, estudos de compatibilidade, cristalinidade e discriminação de polimorfos e para avaliar se as condições experimentais foram adequadamente estabelecidas, uma vez que o polimorfismo pode ser a causa de diferenças no desempenho de formulações farmacêuticas (GIL et al., 2007).

3.8.3 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman, durante as duas últimas décadas, tem sido uma ferramenta de pesquisa bastante usada na área farmacêutica. Embora haja uma abundância das publicações recentes que tratem das aplicações da espectroscopia de Raman, o número de estudos quantitativos é ainda limitado. Diversos trabalhos demonstram o número de vantagens dessa técnica sobre a de infravermelho, principalmente por não haver interferência da água nos espectros. Mas também apresentam algumas desvantagens, como equipamento de alto custo e a complexidade dos lasers e dos sistemas detectores.

A técnica de Raman é uma espectroscopia molecular vibracional que deriva de um processo de espalhamento de luz. Trata-se de uma técnica que usa uma fonte monocromática de luz a qual, ao atingir um objeto, é espalhada por ele, gerando luz de mesma energia ou de energia diferente da incidente. No primeiro caso, o espalhamento é chamado de elástico e não é de interesse, mas no segundo (espalhamento inelástico) é possível obter muitas informações importantes sobre a composição química do objeto a partir dessa diferença de energia. Na prática, um feixe de radiação laser (monocromática, portanto) de baixa potência é usado para iluminar pequenas áreas do objeto de interesse e ao incidir sobre a área definida, é espalhado em todas as direções, sendo que uma pequena parcela dessa radiação é espalhada inelásticamente, isto é, com frequência (ou comprimento de onda) diferente da incidente. Essa técnica é principalmente aplicada para vibração simétrica, grupo não polar e banda homoatômica, tais como S=S, S-S, N=N, C=C, e O=O, enquanto a espectroscopia de infravermelho é aplicada para vibração assimétrica, grupo polar e banda heteroatômica, como C=O, O-H, e H-Cl. Portanto, esses dois tipos de espectroscopias são complementares para caracterizar a formação de complexos (STORPIRTS et al., 2011).

3.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas do conhecimento, sendo amplamente utilizada para estudar os aspectos estruturais dos materiais. O uso desta técnica vem se tornando mais frequente por fornecer informações detalhadas, com aumentos de até 300.000 vezes do estado de cristalização de produtos obtidos por diferentes técnicas de complexação e dispersão. O conhecimento da microestrutura dos materiais permite o

entendimento e, em muitos casos, até a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos. A partir da técnica avalia-se a contribuição com relação à diminuição da cristalinidade das partículas obtidas através dos diversos métodos (CANEVAROLO-JÚNIOR et al., 2003).

Nas misturas físicas é possível distinguir as partículas de fármaco das partículas do material hospede. Porém, quando um complexo é formado, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura física. Apesar dos estudos de MEV serem inadequados para confirmar a formação de complexos de inclusão, as alterações drásticas na forma das partículas, bem como no seu aspecto e tamanho apontam para a existência de novas espécies (ALVES, 2013).

Diferentemente do microscópio óptico, que usa luz para formação de imagem, os microscópios eletrônicos utilizam elétrons. Várias são as vantagens em se utilizar um microscópio eletrônico em relação a um óptico, a principal delas é a resolução, definida como a menor distância entre dois pontos da amostra que podem ser visualizados como dois pontos distintos na imagem. O MEV é, sem dúvida, o microscópio eletrônico mais versátil, devido às suas várias características. É utilizado geralmente para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente grandes, e suas imagens têm alta profundidade de foco, o que significa obter diferentes relevos da superfície da amostra simultaneamente, são imagens tridimensionais e, portanto, mais fáceis de interpretar que as imagens de projeção de microscopia de transmissão. A preparação de amostras e a obtenção de imagens são relativamente simples. A combinação destas características justifica o fato do microscópio eletrônico de varredura ser hoje um dos equipamentos mais utilizados na pesquisa de materiais (SOARES-SOBRINHO, 2009).

Nesse tipo de microscopia a imagem é formada coletando-se um sinal particular em função da posição do feixe sobre a amostra. No caso da detecção de elétrons secundários, que são os formadores mais comuns de imagem, é produzido um sinal elétrico a cada ponto varrido na superfície da amostra. Ao mesmo tempo, este sinal é varrido através da tela de um tubo de raios catódicos (CRT), enquanto o brilho deste sinal é modulado por um amplificador de corrente do detector. A varredura do feixe de elétrons sobre a amostra é, portanto, sincronizada com a varredura do sinal intensificado no CRT, preservando assim a correspondência espacial entre a amostra e a imagem. A determinação da ampliação da imagem é extremamente simples, uma vez que esta não envolve lentes, sendo a ampliação linear obtida pela razão entre o comprimento da varredura do sinal gerado na CRT e o comprimento da varredura do feixe sobre

a amostra. Assim, uma área varrida na amostra de 100 μ m de comprimento e apresentada em uma imagem com 10 cm de comprimento na tela de um monitor, corresponde a uma ampliação de 1.000 vezes (CANEVAROLO-JÚNIOR et al., 2003).

3.8.5 BET (Brunauer-Emmet-Teller) e Tamanho de Poro

A sigla BET tem origem em Brunauer, Emmett e Teller, os nomes dos pesquisadores que, em 1938, propuseram este método. Esta análise (também conhecida como ASA – análise de área superficial) mede a área superficial específica por unidade de massa e é um dos modos mais antigos de caracterização, consistindo na medida da fisissorção (adsorção física) de um gás inerte, como o N₂ que pode ser feita por um único ponto ou por vários pontos da amostra (FERREIRA, 2009).

Existem várias teorias para a medida da área superficial e porosidade utilizando a sorção de gás. Para determinar a área superficial, amostras de sólidos são pré-tratadas aplicando-se combinação de calor e vácuo ou fluxo de gás para remover contaminações adquiridas da exposição à atmosfera. O sólido é então resfriado, sob vácuo, um adsorbato (material que foi retido pelo processo de adsorção) normalmente utilizado é o gás nitrogênio que é admitido ao sólido em aumentos controlados. Após cada dosagem de adsorbato, a pressão é equilibrada e a quantidade de gás adsorvido a cada pressão, a uma temperatura constante, define uma isoterma de adsorção, da qual a quantidade de gás exigida para formar uma única camada sobre a superfície externa do sólido e seus poros é determinada (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

Com a área coberta por cada molécula de gás adsorvido conhecida, a área da superfície pode também ser calculada. À medida que a adsorção continua a espessura da camada adsorvida aumenta (FERREIRA, 2009; TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

Os fundamentos da técnica analítica são: uma amostra acondicionada em um tubo sob vácuo é resfriada à temperatura criogênica e exposta a um gás de análise sob uma série de pressões controladas com precisão. A cada aumento de pressão, o número de moléculas adsorvidas na superfície aumenta. A pressão na qual o equilíbrio da adsorção ocorre é medida e a lei universal dos gases é aplicada para determinar a quantidade de gás adsorvido. Qualquer microporo na superfície é rapidamente preenchido, fazendo com que a superfície livre se torne

completamente coberta e finalmente os poros grandes são cheios. O processo deve continuar até o ponto de condensação volumétrica do gás de análise (OLIVEIRA, 2008; WEBER, 2008).

Em seguida o processo de dessorção deve começar ao passo que a pressão é sistematicamente reduzida resultando na liberação das moléculas adsorvidas. Assim como no processo de adsorção, a variação na quantidade de gás na superfície do sólido é quantificada. Estes dois conjuntos de dados descrevem as isotermas de adsorção e dessorção. As análises das formas das isotermas revelam informações sobre as características da superfície e dos poros do material (FERREIRA, 2009).

3.8.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização das substâncias e dos seus complexos, principalmente pela rapidez das análises. Dentre o mais utilizado, tem-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC), que permite a detecção qualitativa e quantitativa de todos os processos em que requer produção de energia. Essa técnica é uma derivada da análise térmica diferencial (DTA), por isso, são consideradas técnicas semelhantes e complementares, pois permitem avaliar as variações entálpicas que ocorrem com uma dada substância durante um processo de aquecimento ou resfriamento. A palavra “diferencial” enfatiza as medidas que envolvem tanto a própria substância como o material de referência (termicamente estável) (STORPIRTIS et al., 2011).

É uma técnica bastante utilizada na prática farmacêutica, devido a sua habilidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância, mostrando-se como um instrumento analítico importante na caracterização de interações no estado sólido entre fármacos e materiais transportadores. A formação de complexos pode ser identificada nos perfis de DSC, pelo desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e variações relevantes na entalpia do fármaco puro e complexado (STORPIRTIS et al., 2011).

O DSC permite a detecção quantitativa e qualitativa de todos os processos em que a entalpia é absorvida ou produzida (transformações de fase endotérmica ou exotérmica). O método usual de medida é o aquecimento de amostras teste e referência de tal maneira que a temperatura das duas é mantida. Se uma transição de fase ocorre na amostra teste, o calor é aplicado a esta amostra de modo que sua temperatura fique na mesma faixa que na amostra referência, o calor adicional exigido gravado é usado para quantificar a energia da fase de

transição. Transições exotérmicas, tais como, a conversão de um polimorfo em um polimorfo mais estável, pode também ser detectada. Desde que o método seja quantitativo, o grau de cristalinidade também pode ser calculado para sistemas em que o fármaco seja em parte amorfo e em parte cristalino, entretanto, cristalinidade abaixo de 2% geralmente não pode ser detectada por DSC (SOARES-SOBRINHO, 2009).

Quando a substância sofre um evento térmico, a diferença entre o fluxo de calor na amostra e na substância referência é contabilizada frente ao tempo ou a temperatura em que ocorreu, sob uma atmosfera específica. Como resultado, tem-se as temperaturas e energias envolvidas nos vários eventos térmicos ocorridos, tais como fusão, temperatura de transição vítrea e cristalização, entre outros (MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010).

Os principais fenômenos químicos observados nas curvas DSC são: quimiossorção, dessolvatação, desidratação, decomposição, degradação oxidativa, oxidação em atmosfera gasosa, reações de oxirredução, reações de estado sólido, polimerização, reações catalíticas, entre outras. Contudo, deve-se ressaltar que, nesta técnica, a temperatura de operação da célula não excede 725°C (STORPIRTIS et al., 2011).

3.8.7 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria (TG) é uma técnica de análise térmica em que a variação da massa da amostra, perda ou ganho, é determinada como uma função da temperatura e/ou tempo enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer detalhadamente as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias. Permite estabelecer a faixa de temperatura em que as mesmas adquirem composição química definida ou as temperaturas em que começam a se decompor, bem como para acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação e decomposição (CANEVAROLO, 2004).

Os experimentos são executados por meio de uma termobalança, a qual apresenta elevada sensibilidade, reprodutibilidade e insensibilidade a variações externas, bem como rápida resposta às variações de massa. Os parâmetros experimentais incluem taxa de aquecimento, atmosfera (N₂ ou O₂), vazão de gás, quantidade de amostra, granulometria, forma cristalina, composição do cadinho e o calor de reação envolvido (IONASHIRO, 2004).

Por meio da TG podem-se avaliar fenômenos químicos (quimiossorção, dessolvatação, decomposição, degradação oxidativa, degradação redutiva e reações de estado sólido) e físicos (desidratação, vaporização, sublimação, adsorção, dessorção e absorção). Pelas curvas TG podem-se obter informações quanto à estabilidade e composição da amostra e seus produtos intermediários de reação, nessas curvas, os degraus correspondem a variações de massas, que podem ser utilizados ainda para fins quantitativos. Nesse contexto, a derivada das curvas TG (DTG) apresentam, para cada degrau, picos agudos, tornando a informação, visualmente, mais acessível e com melhor resolução (PEREIRA et al., 2009).

Três modelos de TG são comumente usados: TG isotérmica, em que a massa da amostra é registrada em função do tempo a temperatura constante; TG quase isotérmica, em que a amostra é aquecida a uma razão linear enquanto não ocorre variação de massa. A partir do momento em que a balança detecta a variação de massa a temperatura é mantida constante até se obter um novo patamar, característico de massa constante, e assim sucessivamente; TG dinâmica ou convencional, em que a temperatura da amostra varia de maneira predeterminada preferencialmente, a uma razão de aquecimento ou resfriamento linear (STORPIRTIS et al., 2011).

3.8.8 Espectroscopia no UV-Visível

O UV-Visível talvez seja uma das técnicas mais utilizadas em todo o mundo, em especial em análises quantitativas em laboratórios químicos, clínicos e farmacêuticos. Entre as vantagens dela está facilidade de manuseio ou operação, boa sensibilidade, boa exatidão, seletividade moderada e ampla aplicabilidade (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Gil e colaboradores (2007) mostram que nesse tipo de análise a relação fotometria-luz deve ser encarada em termos de energia e não em termos de luz e cor. A energia, por sua vez, apresenta relação inversa com o comprimento de onda, simbolizado por λ , a unidade empregada para medida de λ é o nanômetro (nm). Na faixa espectral do UV-visível, a interação entre matéria e energia se dá por transições eletrônicas. Assim, a espectroscopia no UV-visível é também, convenientemente, denominada de espectrometria de absorção eletrônica.

O grau com que ocorre absorção da energia luminosa depende das transições eletrônicas possíveis para a molécula (matéria) e da intensidade de energia. Essa absorção, em cada

comprimento de onda, depende da natureza da substância, da concentração e do caminho ótico (GALO e COLOMBO. 2009).

O ponto de intersecção de um grupo de espectros sobrepostos expressos em função da concentração, evidência a presença de uma mistura de dois estados e é denominado ponto isobéptico. Em relação à espectroscopia de UV-Vis, a presença de um ponto isobéptico pode ser considerada uma forte evidência para a formação de complexo de inclusão. Por outro lado, a inexistência desse ponto não significa a ausência de complexos de inclusão, uma vez que este constitui somente uma parte da evidência em estudos de sistemas envolvendo complexos, a qual é importante juntamente com outras provas consistentes (SOARES-SOBRINHO, 2009).

A principal aplicação do UV-visível é o doseamento de fármacos, e pode ser obtido segundo as seguintes configurações metodológicas: amostra x padrão, amostra x equação da reta, amostra x extinção específica e titulação fotométrica (GIL et al., 2007).

3.8.9 Microscopia de luz polarizada

A luz polarizada é uma técnica de aumento de contraste que eleva a qualidade da imagem obtida com materiais birrefringentes quando comparada com outras técnicas, tais como a iluminação de campo escuro e de campo claro, contraste de interferência diferencial, contraste de fase, Hoffman contraste de modulação, e fluorescência. Microscópios de luz polarizada têm um elevado grau de sensibilidade e pode ser utilizado para ambos os estudos quantitativos e qualitativos orientados para uma vasta gama de amostras anisotrópicas (SHAH et al., 2013).

A fim de realizar esta tarefa, o microscópio deve ser equipado com um polarizador, posicionado no caminho da luz em algum lugar antes da amostra, e um analisador (um segundo polarizador), colocado no caminho ótico entre a abertura traseira da objetiva e os tubos de observação ou porta da câmera. O contraste de imagem resulta da interação da luz plano-polarizada com um espécime birrefringente para produzir dois componentes individuais que são ondas polarizadas em planos mutuamente perpendiculares. As velocidades destes componentes são diferentes e variam com a direção de propagação através do espécime. Depois de sair do espécime, os componentes de luz tornam para fora da fase, mas são recombinados com interferência construtiva e destrutiva quando eles passam através do analisador (MURPHY; SPRING; DAVIDSON, 2015).

Além disso, a técnica de aumento de contraste explora as propriedades ópticas específicas, a anisotropia e revela informação detalhada sobre a estrutura e composição de materiais que são de valor inestimável para fins de diagnóstico e de identificação (ROBINSON e DAVIDSON, 2015).

Os materiais isotrópicos, que incluem uma variedade de gases, líquidos, vidros, cristais cúbicos, demonstram as mesmas propriedades ópticas, quando sondado em todas as direções. Estes materiais têm apenas um índice de refração e nenhuma restrição na direção da luz que passa através deles. Em contraste, os materiais anisotrópicos, que incluem 90% de todas as substâncias sólidas, têm propriedades ópticas que variam de acordo com a orientação da luz incidente com os eixos cristalográficos. Eles demonstram uma gama de índices de refração, dependendo tanto da direção de propagação da luz através da substância como das coordenadas do plano de vibração. Mais importante ainda, os materiais anisotrópicos agem como separadores de feixe e dividem os raios de luz em dois componentes ortogonais (BIRREFRINGÊNCIA, 2014).

3.9 Ensaios de dissolução

O sucesso no desenvolvimento de novos fármacos requer não apenas estudos de otimização das interações ligante-receptor, como também é preciso que o fármaco atinja seu alvo. Para que a absorção do fármaco ocorra é necessário que as suas moléculas estejam em solução no local de absorção. Logo, a dissolução da forma farmacêutica sólida nos fluidos gastrointestinais é um pré-requisito para que ocorra a absorção seguida da distribuição do fármaco para a circulação sistêmica, dependente em parte, da solubilidade do fármaco no meio que o rodeia (SOARES-SOBRINHO, 2009).

Durante muitos anos o teste realizado para verificar a liberação do fármaco da sua forma farmacêutica foi o de desintegração, o primeiro *in vitro* utilizado amplamente pela indústria farmacêutica, devido a seu baixo custo, rapidez e facilidade de execução. Com o passar do tempo, entretanto, ficou claro que apenas esse teste não era completamente adequado, uma vez que um comprimido pode ser rapidamente fragmentado em partículas menores que, por sua vez, podem não liberar o fármaco totalmente ou na velocidade adequada para estar disponível e exercer seu efeito. O teste de dissolução mostrou ser mais importante na indicação da efetividade clínica da formulação que o teste de desintegração, embora se acreditasse

inicialmente que o tempo de desintegração estivesse diretamente relacionado com a disponibilidade biológica do fármaco (MARCOLONGO, 2003).

Os ensaios de dissolução de fármacos é uma parte fundamental no desenvolvimento do produto e produção de medicamentos, sendo também empregados como uma ferramenta de controle de qualidade para monitorar a liberação do fármaco comparando lote a lote a partir de um produto. Esse é um teste oficial analítico, que envolve vários passos de amostragem, utilizado para avaliar a liberação do fármaco de formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas, sob interface da temperatura e composição do solvente padronizado, onde a quantidade cumulativa de fármaco que é dissolvido num meio de dissolução é medida em função do tempo com base no ultravioleta. Os ensaios de dissolução foram desenvolvidos em primeiro lugar para quantificar a quantidade e extensão da liberação de fármaco a partir de formas orais sólidas, incluindo comprimidos de liberação imediata/prolongada e cápsulas. Mais recentemente, tornou-se importante a dissolução na liberação do fármaco teste de formas de dosagem, tais como pós, comprimidos mastigáveis, comprimidos sublinguais e bucais, as gomas de mascar, cápsulas de gelatina mole, supositórios, emplastros transdérmicos, aerossóis e semi-sólidos (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; PAAKKUNAINEN et al., 2009; QURESHI e SHABNAM, 2003).

Esse ensaio é um pré-requisito para a absorção do fármaco que, por sua vez, influencia a taxa e extensão na qual a dose de um fármaco administrado atinge a circulação geral. Para muitos fármacos que atravessam a mucosa intestinal facilmente o aparecimento de níveis de fármaco vai ser controlado pelo tempo requerido para a forma farmacêutica libertar o seu conteúdo de fármaco e, em seguida, para o fármaco dissolver-se. A proliferação de interesse na dissolução pode ser atribuída, principalmente, para os fármacos que tendem a ser muito insolúveis devido ao fato de que a etapa limitante da taxa de solubilidade no processo de absorção do fármaco a partir do trato gastrointestinal é frequentemente a dissolução do fármaco a partir da forma de dosagem (JAMBHEKAR e BREEN, 2013).

Processos de dissolução de fármacos e seus efeitos indiretos sobre a biodisponibilidade parecem ser processos interdependentes que são influenciados pelas propriedades físico-químicas do fármaco, em especial fármacos hidrofóbicos, porém a biodisponibilidade oral de um fármaco é determinada por um número de propriedades, incluindo a taxa de dissolução do fármaco, a solubilidade, parâmetro termodinâmico que representa a concentração da solução de um fármaco em equilíbrio com o soluto (fator que mais afeta a velocidade de dissolução),

permeabilidade intestinal e metabolismo pré-sistêmico, isso proporcionou um impulso para caracterizar e estimar essas propriedades no processo de descoberta de fármacos. Vários modelos de dissolução dos fármacos mostram que a difusividade do mesmo, a solubilidade no trato gastrointestinal, a área de superfície do sólido umedecido pelo fluido luminal e a hidrodinâmica de fluidos gastrointestinais todos têm um papel crucial na determinação da taxa de dissolução *in vivo*. Os agentes terapêuticos com solubilidades aquosas inferior a 100 mg/ml, frequentemente apresentam limitações de dissolução para absorção, portanto, todos os fatores que influenciam a dissolução do fármaco provavelmente influenciam a absorção do mesmo e, por conseguinte, a biodisponibilidade (MARCOLONGO, 2003).

É evidente que o tamanho de partícula do pó, mais especificamente, a área de superfície do pó, é um dos fatores importantes no processo de dissolução do fármaco. A área de superfície da partícula do pó, por sua vez, está inversamente relacionada com o tamanho de partícula e a taxa de dissolução é diretamente proporcional à área de superfície disponível para a dissolução. Para fármacos pouco solúveis e muitos fármacos hidrofóbicos, redução dos tamanhos de partículas de cerca de 3-5 μm é freqüentemente utilizada como uma estratégia de sucesso para aumentar a taxa de dissolução de fármacos. É importante notar que, para alguns fármacos uma grande redução do tamanho das partículas pode levar à exposição das cargas de superfície, o que pode retardar a velocidade de dissolução. Se o meio de dissolução exibe propriedades de molhagem pobres, micronização pode produzir aglomeração das partículas de pó, o que pode causar uma diminuição na taxa de dissolução, devido a um aumento da área de superfície (JAMBHEKAR e BREEN, 2013).

Além destes fatores, a permeabilidade da parede do TGI ao fármaco desempenha papel importante na manutenção das condições *sink* (menos de 20% da concentração de saturação) na dissolução, as quais são requeridas para atingir a taxa de dissolução mais rápida possível. Para fármacos altamente permeáveis, as condições *sink* são provavelmente mantidas, caso no qual a taxa de dissolução por unidade de superfície será constante e próxima da taxa de dissolução inicial. Para fármacos menos permeáveis, a taxa de dissolução por unidade de superfície diminuirá com o tempo, devido ao aumento gradual do fármaco em solução no lúmen. As condições do lúmen do TGI variam largamente quer intra quer inter-individualmente, a variabilidade inter-individual é devida a variações genéticas normais nas populações bem como de estados de doença. A variabilidade intra-individual pode ser resultado do ritmo

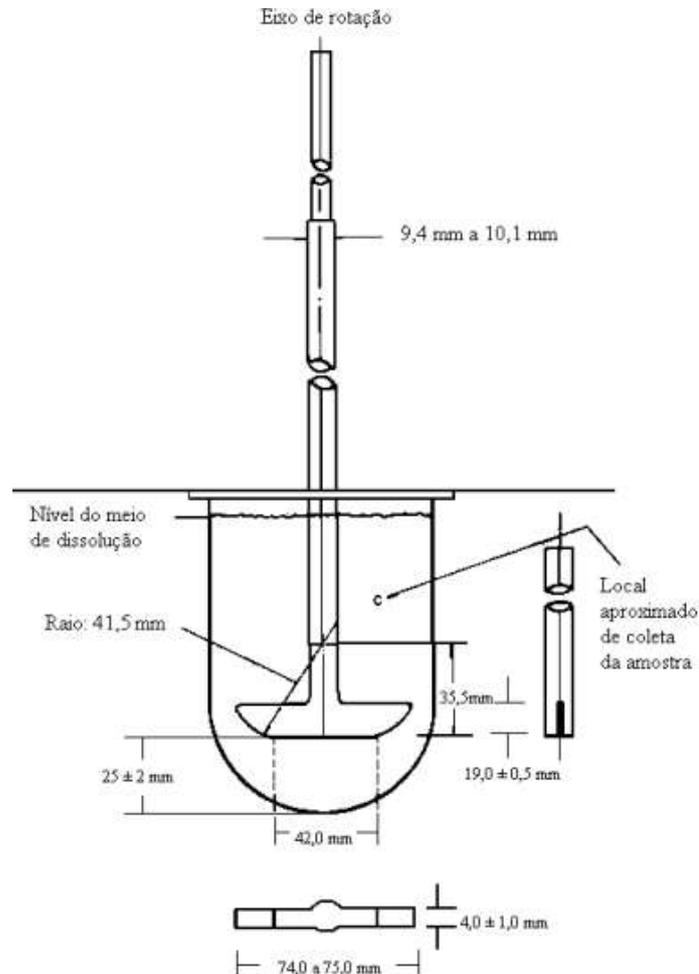
circadiano, ingestão de alimentos, nível de atividade física e nível de estresse, entre outros (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Quando um fármaco hidrofóbico não é bem molhado pela água, isto é, quando o ângulo de contato é elevado, a superfície do trato gastrointestinal pode facilitar a molhagem de um fármaco por fluido luminal, aumentando assim a capacidade do fluido gastrointestinal penetrar entre as partículas do pó e em poros. O fármaco pode ser considerado "pouco solúvel", quando a sua velocidade de dissolução é mais lenta do que o tempo que leva para atravessar seus sítios de absorção, o que resulta em biodisponibilidade incompleta (JAMBHEKAR e BREEN, 2013).

Portanto, a dissolução *in vitro* tem sido reconhecida como um elemento importante no desenvolvimento de medicamentos. O desenvolvimento de novas formulações com perfis de liberação modificada justifica a necessidade de definir especificações e critérios de aceitação alternativos, com o objetivo de se manter a credibilidade e validade dos resultados. Aumentar a taxa de dissolução de fármacos fracamente solúveis e a sua biodisponibilidade vem sendo um desafio importante para os cientistas farmacêuticos (KHADKA et al., 2014).

A escolha da aparelhagem para realização do teste de dissolução é determinada pelas características físico-químicas da forma farmacêutica. A pá agitadora (Figura 10) é um modelo simples, robusto, adequadamente definido, padronizado e utilizado em todo o mundo, sendo conseqüentemente fundamentado numa vasta experimentação, razão pela qual é recomendado nos compêndios oficiais como primeira escolha para os ensaios de dissolução *in vitro* de formulações de liberação imediata ou modificada. O aparelho é constituído por um recipiente cilíndrico de fundo arredondado, de vidro ou outro material transparente apropriado não reagente e que não interfira no teste de nenhuma maneira, munido de uma tampa, que evita a evaporação e que tem um orifício central destinado à passagem da haste do agitador, e vários outros, que permitem a introdução de um termômetro e dispositivos para coleta de amostras; um agitador constituído por uma haste vertical, que na extremidade inferior tem fixada uma pá, cuja forma corresponde a uma porção de círculo delimitada por dois planos paralelos. A haste deve ser montada de tal modo que o eixo não se afaste mais de 2 mm do recipiente e a parte inferior da pá se situe a uma distância de 25 mm (± 2 mm) do fundo do recipiente. A parte superior da haste do agitador liga-se a um motor munido de um regulador de velocidade. A rotação do agitador deve ser uniforme, sem oscilações apreciáveis; um banho termostatizado, que permite manter a temperatura do líquido de dissolução a 37 °C ($\pm 0,5$ °C) durante todo o ensaio (MARCOLONGO, 2003).

Figura 10 - Modelo de agitador de dissolutor no modelo de pás.



Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010.

São estabelecidas também algumas recomendações, como utilização de meio aquoso, meios de dissolução típicos listados na USP são ácido clorídrico diluído e tampões na gama de pH fisiológico, valores de pH recomendados variam entre as diversas farmacopéias, devendo situar-se entre 1 e 7,8. Valores mais elevados de pH devem ser justificados caso a caso e, em geral, não deverão ser superiores a 8, temperatura deve estabelecer-se a 37 °C ($\pm 0,5$ °C), as velocidades de rotação são variadas, podendo ser usualmente entre 50 e 100 rpm. No caso do aparelho de fluxo contínuo, deve-se estabelecer um caudal entre 8 e 50 mL/min. Quanto aos cilindros oscilantes, a velocidade ou o tempo de cada revolução é especificada em cada monografia (AZARMI; ROA; LöBENBERG, 2007).

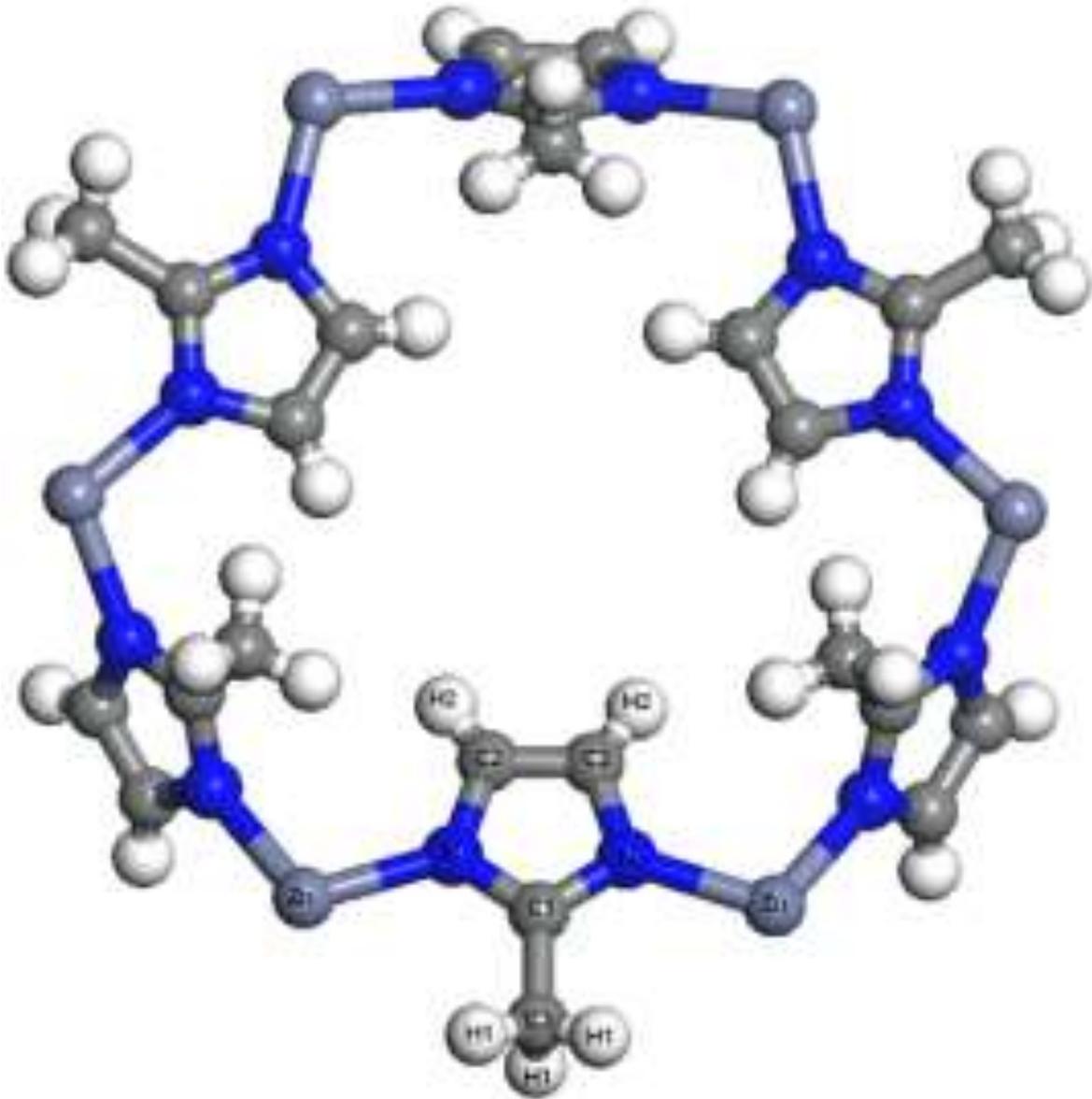
A velocidade intrínseca de dissolução (VID) é uma característica inerente a cada substância sólida e, diferentemente das medidas de solubilidade, que se baseia em equilíbrio, esta constitui um parâmetro cinético dependente da molhabilidade e da difusibilidade do composto. A determinação da VID fornece indícios se determinado fármaco apresentará problemas de biodisponibilidade em função de suas características de dissolução. Levando em consideração a natureza química da substância o estado amorfo, cristalino e a existência de polimorfos são alguns dos fatores a se considerar. Geralmente, substâncias amorfas são mais solúveis que as cristalinas, assim como substâncias anidras são mais solúveis que as hidratadas do mesmo fármaco (MARCOLONGO, 2003).

As formas farmacêuticas sólidas orais de liberação modificada são aquelas em que a formulação propicia uma modificação na taxa ou local onde o fármaco é liberado, estas estão adquirindo importância cada vez maior, quer pelas suas vantagens ao nível da aceitação por parte do paciente, quer pelas vantagens terapêuticas que apresentam face às correspondentes formas farmacêuticas sólidas de liberação convencional. Por este fato, e no seguimento da evolução relativa às formas farmacêuticas de liberação modificada, é necessário desenvolver estudos de dissolução, com elevado grau de confiança, que traduzam *in vitro* resultados obtidos *in vivo* (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; MARCOLONGO, 2003).

Vários são os fatores que devem ser levados em consideração no desenvolvimento de um teste de dissolução para essas formas, mecanismo de liberação do fármaco, propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, variabilidade nas condições *in vivo* como presença de alimentos no TGI e horário de administração. Nas formulações de liberação prolongada, devido aos diferentes mecanismos envolvidos na liberação do fármaco a partir deste tipo de formulação não é possível estabelecer especificações padronizadas. Genericamente, as especificações a estabelecer para estes casos consistem em pelo menos três pontos:

- 1º ponto – 1 a 2 horas – liberação de 20-30% do teor rotulado: pretende-se prevenir a liberação imediata de toda a dose;
- 2º ponto – deve definir o padrão de dissolução, devendo por isso corresponder à liberação de cerca de 50% do teor rotulado;
- 3º ponto – deve garantir a quase totalidade da liberação da dose (a partir de 80% do teor rotulado). Os ensaios de dissolução efetuados como controle de qualidade prolongam-se até o tempo em que pelo menos 80% do fármaco está dissolvido. Períodos de ensaio mais curtos podem ser aceites em casos especiais, mas requerem justificação baseada em estudos

comparativos *in vitro* e *in vivo* que deverão cobrir um período mínimo de 24 horas (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; MARCOLONGO, 2003).



MATERIAL E MÉTODOS

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

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos, utilizados durante toda a parte experimental do presente trabalho, estão descritos a seguir.

4.1 Material

O BNZ foi adquirido do LAFEPE[®] - lote 301045, enquanto a ZIF-8 – lote S45328-308 foi doada pelo Laboratório de Terras Raras-UFPE. Também foi utilizada acetona (Química Moderna[®] - lote 03196) e água ultra-pura (Mili-Q[®]).

Para o preparo dos meios do ensaio de dissolução, utilizaram-se fosfato de potássio (Vetec[®] - lote 1007140) e hidróxido de sódio (Sigma Aldrich[®] - lote SLBM7637).

4.2 Obtenção do Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8

A Figura 11 esquematiza o processo de produção dos sistemas BNZ:ZIF-8. O mesmo procedimento foi utilizado para a produção de sistemas em diferentes proporções (1:1, 1:3 e 3:1), tendo como base os pesos moleculares do BNZ e da ZIF-8, como sendo 260,25 e 229,61 g.mol⁻¹, respectivamente. Inicialmente, o fármaco foi disposto em *erlenmeyers* com capacidade para 250 mL e solubilizado em água ultra-pura (Mili-Q[®]) ou acetona, nas concentrações de 15 e 20 µm.mL⁻¹ respectivamente. A idéia de testar dois diferentes solventes visa a otimização de obtenção dos sistemas, tanto reduzindo o número de moléculas de água incorporadas à ZIF-8, como reduzindo o custo do processo no que tange uso de solvente orgânico e gasto de energia elétrica devido ao menor tempo no procedimento de agitação.

A solução de BNZ foi sonicada, com sonicador Limp Sonic[®], modelo LS-3D-2-x, por 10 minutos, a fim de garantir a completa solubilização do fármaco. Em seguida, a ZIF-8 foi adicionada à solução e o volume foi completado para 250 mL, seguido de agitação intermitente em Agitador Magnético MA089 Marconi[®] com auxílio de barra magnética por sete dias. Diariamente, 0,33 mL do sobrenadante foi coletado para posterior filtração com filtro microporoso 0,2 µm e quantificação em espectroscopia por absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) do Modelo 1240, Shimadzu[®] – com auxílio de uma curva de calibração

previamente realizada (Equação da reta: $y=0,0316x-0,0003$; $r^2= 0,9994$) – para a construção de uma curva de incorporação aparente do BNZ à rede da ZIF-8.

Essas curvas de calibração foram construídas, tomando como base o método desenvolvido por Soares-Sobrinho e colaboradores (2006). O experimento visou o decaimento da concentração do fármaco, justificada pela sua incorporação a malha da ZIF-8. Tal decaimento foi avaliado diariamente e a porcentagem de BNZ incorporado foi mensurada subtraindo o valor da concentração real utilizada no experimento pela concentração dissolvida encontrada, representadas em termo de porcentagem (Equação 1).

$$\%BNZ_{incorporado} = \left(\frac{C_{final} \times 100}{C_{inicial}} \right) - 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: C – concentração.

Após as referidas etapas, procedeu-se a secagem do material através de liofilização (Liofilizador L101 LioTop[®]) ou estufa de secagem com fluxo de ar a 35 °C (Ethik Technology[®]) até completa secagem, para os sistemas obtidos com água e acetona, respectivamente.

Figura 11 - Fluxograma para obtenção dos Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.



FONTE: Dados da pesquisa.

Todo esse procedimento ocorreu em triplicata e protegido da luz, devido à fotossensibilidade inerente à molécula do BNZ, como foi observado por trabalhos anteriores do grupo (SANTOS et al., 2015).

No caso da obtenção em acetona, os *erlenmeyers* foram vedados por rolhas, a fim de reduzir a volatilidade do solvente. O solvente volatilizado foi repostado após verificação de perda de massa, tomando como base o valor de $0,79 \text{ g.mL}^{-1}$ para acetona.

Em seguida foi realizada a redispersão do sistema em água – a fim de suspender o BNZ residual – seguido de filtração e centrifugação a 2000 rpm repetidamente a cada dez minutos, a fim de garantir o real valor de fármaco associado.

4.3 Caracterização do Benznidazol, Mistura Física e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8

A seguir, estão expostas todas as técnicas de caracterização físico-química que exploram o material trabalhado a fim de corroborar a formação do sistema. Para fins comparativos foram obtidas Misturas Físicas (MF) na proporção molar 1:1 (mol:mol) mediante simples agitação (5 minutos) em frasco de penicilina.

4.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Para a obtenção da varredura de 200 a 1000 nm por espectrofotometria na região UV utilizou-se espectrofotômetro ultravioleta da marca SHIMADZU® UV-Vis mini 240 PC e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm.

4.3.2 Análise térmica

A seguir, foram descritas as técnicas de análise térmica utilizadas para determinação do perfil térmico do BNZ, ZIF-8, mistura física (MF) e sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1).

4.3.2.1 Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60-H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa da amostra cerca de 3 mg ($\pm 0,05$) para o BNZ e a ZIF-8 isolados e 6 mg ($\pm 0,05$) para as MF e sistemas, as amostras foram acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 1000°C na razão

de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Antes dos ensaios, a termobalança foi verificada com oxalato de zinco.

4.3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas utilizando Calorímetro Shimadzu[®] DSC-60 interligado ao software Shimadzu[®] TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de $25\text{-}500^{\circ}\text{C}$. As amostras foram colocadas em porta-amostra de alumina hermeticamente fechada com massa de $3\text{ mg} (\pm 0,2)$ para BNZ e ZIF-8 isolados e $6\text{ mg} (\pm 0,2)$ para MF e sistemas. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

4.3.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho do BNZ, MF e sistemas foram obtidos utilizando o equipamento Perkin Elmer[®] (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. Os resultados foram obtidos por meio de varreduras de $4500\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$.

4.3.4 Difractometria de Raios-X (DR-X)

A análise de DR-X foi realizada em difratômetro XRD-7000 da SHIMADZU[®], equipado com ânodo de cobre a uma velocidade de varredura de $1,2^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa do ângulo 2θ de $5^{\circ} - 45^{\circ}$.

Por se tratar de um material lamelar, o cálculo do espaçamento basal é uma ótima ferramenta para comprovar a formação dos sistemas. O espaço entre as lamelas pode mudar

com o aporte do fármaco, tanto devido a forma física, como a presença de cargas elétricas (XIONG et al., 2015).

O cálculo do espaçamento basal foi realizado através da equação de Bragg:

$$2.d \cdot \text{sen } \theta = n \cdot \lambda \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: d - espaçamento basal; $\text{sen } \theta$ - seno do ângulo theta; n – constante; e λ - comprimento de onda do cobre.

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A amostra foi preparada sobre dupla fita de carbono contida em suporte (*stub*) de cobre e metalizada sob vácuo com a deposição de uma fina camada de ouro. As análises de MEV foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura da SHIMADZU®, modelo SS-550, com filamento de tungstênio e com acoplamento para dispersão de energia (EDS), utilizando aumento de 300 a 750 vezes.

4.3.6 Microscopia de luz polarizada

Foi utilizado um microscópio petrográfico de marca Olympus®, modelo BX 51, com luz polarizada para a identificação das propriedades ópticas das amostras, com uso do software do próprio microscópio para a obtenção das imagens com escala para registro. Como meio isotrópico difuso de fundo foi utilizado uma lamínula de vidro com 1 mm de espessura. Já como meio anisotrópico difuso de fundo foi utilizado uma lâmina polida de quartzo hialino, gerado através de um corte subparalelo a seção basal do cristal e apresentando uma espessura de 1,1 cm.

4.3.7 Tamanho de partícula por granulometria a laser, análise de área superficial e tamanho e volume de poros

As amostras foram dispersas numa solução de tensoativo Triton X 100 a 0,02% e, posteriormente, foi submetido à sonicação durante 3 minutos. Para a análise da distribuição granulométrica, um analisador da distribuição de partícula Microtac[®] S3500 foi utilizado, com o tempo de medição de 10 segundos, e um fluxo de 70%. Foi utilizado o método Fraunhofer.

A área de superfície específica (S_{BET}) foi calculada com base no método Brunauer-Emmett-Teller (BET) e a distribuição dos tamanhos e volumes do poro foi derivada do método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Foi utilizado analisador de área superficial ASAP2440 Micrometrics[®], e *software* para determinação da S_{BET} . Aproximadamente 200 mg das amostras de BNZ e ZIF-8 foram degaseificadas por 48 horas a 110 °C para remoção de qualquer material adsorvido na superfície do material. As análises foram decorridas na temperatura de atomização de 160 °C com fluxo de ar de 350 mL/h. A adsorção física progressiva de nitrogênio no material foi feita a 77K, com posterior dessorção.

4.3.8 Ensaio quantitativo de solubilidade

O ensaio quantitativo de solubilidade foi realizado a fim de definir as condições *sink*, dado importante para a realização do ensaio de dissolução, a ser descrito no item 4.4.

Excesso de BNZ (aproximadamente 200 mg) foi previamente pesado numa balança da marca Shimadzu[®] modelo AUX 220 e adicionado a tubos de ensaio contendo 10 mL de água ultra-pura Mili-Q[®] (pH 5,1), sendo posteriormente submetidos à agitação constante (aproximadamente 75 rpm) em banho-Maria DUBNOFF 304-D[®], por durante 7 dias à temperatura ambiente. Alíquotas foram retiradas nos dias 1, 4 e 7, a fim de quantificar a concentração máxima dissolvida, visando evidenciar a concentração de saturação do BNZ em água à temperatura ambiente.

4.4 Estudo dos perfis de dissolução *in vitro*

Os ensaios de dissolução foram realizados a fim de definir os sistemas que melhor apresentasse perfil de liberação modificada. Meios de dissolução em diferentes pH's (4,5 e 7,6) foram utilizados para mensurar essa liberação. Os ensaios foram feitos sob temperatura de 37

$\pm 0,5$ °C, utilizando 500 mL de tampões fosfato como meios de dissolução, aparato 2 (pá) e velocidade de rotação 75 rpm, utilizando dissolutor Varian® VK 7010.

Foram pesadas em balança Shimadzu® do modelo AUX 220 quantidades equivalentes a 36,66 mg de BNZ. Em intervalos de tempo predefinidos de 0,08, 0,25, 0,5, 0,76, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7h ou até que houvesse uma liberação do fármaco superior a 80%, 5 mL das amostras foram coletadas, filtradas em filtro de membrana 0,20 μm e, quando preciso diluídas em 15 mL, para quantificação do teor de BNZ por espectroscopia no UV-Vis mini a 323 nm (Modelo 1240, Shimadzu®), utilizando a metodologia previamente validada (SILVA et al., 2007; SOARES-SOBRINHO et al., 2006). Foi efetuada a reposição do meio de dissolução com o mesmo volume de cada alíquota retirada. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata.

Os perfis de dissolução foram avaliados e comparados utilizando o parâmetro de área sob a curva (AUC), percentagem de fármaco dissolvido por tempo de coleta e eficiência de dissolução.

4.4.1 Tratamento de dados

Os dados de dissolução foram corrigidos quanto à perda de volume e fármaco durante as coletas, de acordo com cálculo similar ao encontrado na literatura (ARONSON, 1993; SINGH; KAUR; SINGH, 1997). A equação 3 representa a correção da concentração (C_{corr}) em teste de dissolução em que há reposição.

$$C_{corr} = C_n + \frac{V_S}{V_t} \sum_{i=1}^{n-1} C_i \quad (\text{Equação 3})$$

Na equação, C_n é a concentração no ponto de coleta n , V_t é o volume total inicial, V_S é o volume das coletas e C_i é a concentração das amostras nos pontos anteriores a n .

A eficiência da dissolução (ED%) foi calculada nos tempos correspondentes a 0,25, 0,75 e 2h para BNZ, MF e Sistemas em pH 4,5 e 0,25, 2 e 7h para os mesmos em pH 7,6. A ED% é a área sobre a curva no tempo t da curva de dissolução expressa como porcentagem da área do retângulo em $y^{100\%}$ no mesmo tempo t (KHAN, 1975; KHAN e RHODES 1972). O cálculo de área sob a curva (AUC) e ED% foi realizado com auxílio do *software* Origin® 8 da Origin Lab Solutions e Microsoft Excel® 2007.

4.4.2 Modelos cinéticos

Os resultados do perfil de dissolução também foram analisados quanto ao ajuste a modelos cinéticos. A equação de regressão da reta foi determinada para linhas de tendência dos gráficos correspondentes, seguindo as fórmulas gerais (Tabela 1).

A escolha do modelo matemático foi realizada a partir do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}), o último é calculado pela equação 4, quanto mais próximo de 1 o valor numérico de R^2_{ajustado} melhor a amostra se ajusta ao modelo (ZHANG et al., 2010).

$$R^2_{\text{ajustado}} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times (1 - R^2) \quad (\text{Equação 4})$$

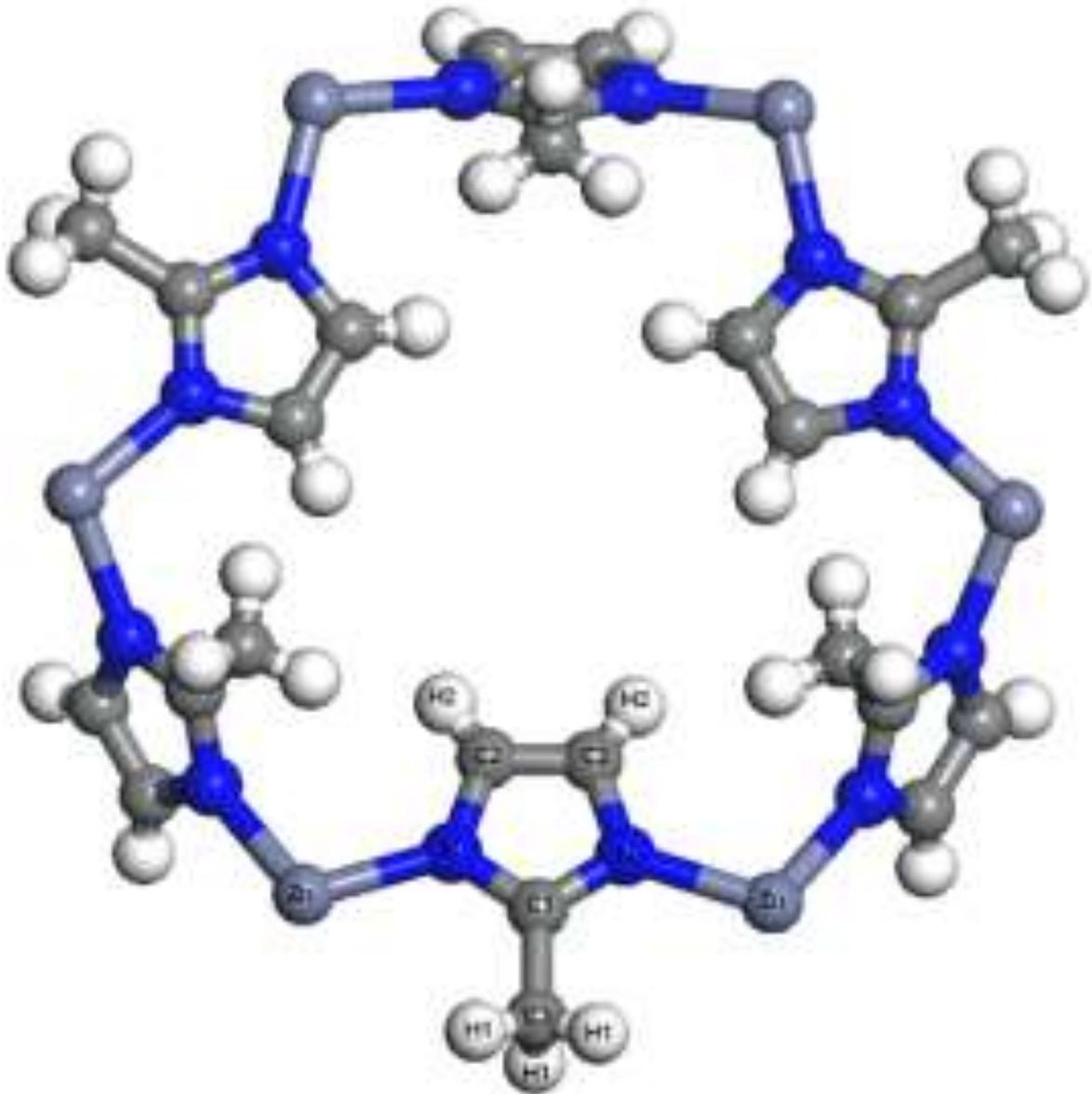
Onde n é o número de pontos da amostra, p é o número de parâmetros do modelo e R^2 é o coeficiente de determinação.

Os cálculos foram realizados utilizando o *software* Microsoft Excel® 2007 e o *add-in* DDSolver® (ZHANG et al., 2010).

Tabela 1 – Modelos matemáticos de cinética usados na avaliação do perfil de dissolução.

Modelo	Equação*	Gráficos plotados
Ordem zero	$Q_0 = Q_t + K_0.t$	Q_0 versus t
Primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1.t$	$\log Q_t$ versus t
Higuchi	$Q_t = K_H.t^{1/2}$	Q_t versus $t^{1/2}$
Peppas-Sahlin	$M_t/M_\infty = K_1.t^m + K_2.t^{2m}$	M_t/M_∞ versus t^m
Korsmeyer-Peppas	$M_t/M_\infty = K.t^n$	M_t/M_∞ versus t

* Q_t - quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 - quantidade inicial de fármaco em solução; Q_∞ - quantidade de fármaco dissolvida no tempo total; M_t - quantidade de fármaco dissolvido no tempo t ; M_∞ - quantidade total de fármaco dissolvido quando a forma farmacêutica se desintegra por completo; K_0 , K_1 , K_2 , K_H , constantes características de cada modelo; t - tempo. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2011.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi feita uma criteriosa discussão sobre a consequência dos achados. Os resultados e a discussão estão descritos a seguir.

5.1 Obtenção dos Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8

A seguir, estão descritos os resultados obtidos e a respectiva discussão no que tange o método para obtenção dos sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.

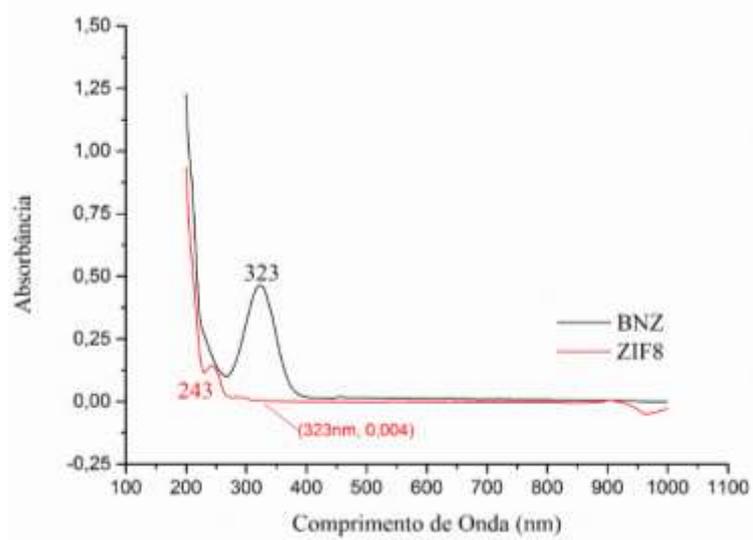
5.1.1 Aspecto macroscópico

Em ambos os sistemas obtidos não foram observadas mudança de coloração. Em relação à morfologia macroscópica do pó, os sistemas apresentaram características bem diferentes da amostra isolada e MF, principalmente com base na reduzida higroscopicidade – característica relevante do BNZ – e na mudança da estrutura do pó para um formato espiculado.

5.1.2 Avaliação da incorporação do fármaco na ZIF-8 na proporção de 1:1

Através da espectroscopia por absorção na região do UV-Vis foi possível determinar o comprimento de onda de leitura a ser utilizado para a quantificação da incorporação do BNZ. Com base na varredura (200-1000 nm) (Figura 12), o BNZ teve máxima absorção em 323 nm, enquanto a ZIF-8, em 243 nm. Embora a ZIF-8 também apresente pico de absorção na região do UV-Vis, o método não perdeu em seletividade, pois a mesma não absorve no mesmo comprimento de onda do BNZ – em 323 nm, a ZIF-8 apresenta um valor de 0,004 de absorbância. Em adição, a ZIF-8 é insolúvel em água e em solventes apolares, sendo excluída do analito no momento que a amostra é filtrada (ALVES, 2013).

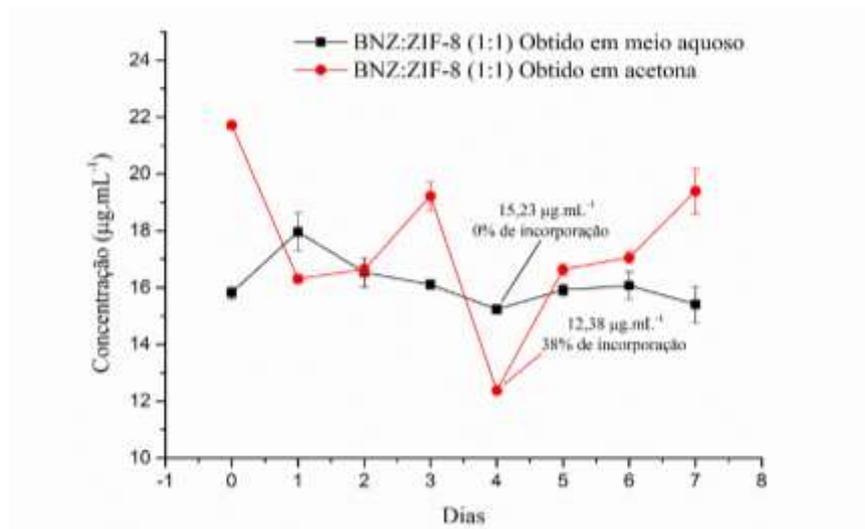
Figura 12 - Varredura do espectro de absorção na região do UV-Vis do BNZ e da ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

Através da análise das curvas de calibração e o cálculo de incorporação aparente do BNZ à rede da ZIF-8, foi possível ver o decaimento da concentração do fármaco justificada pela incorporação à malha da ZIF-8. Essas curvas de incorporação estão demonstradas na Figura 13.

Figura 13 - Curvas de incorporação do BNZ à rede da ZIF-8 em água (preto) e em acetona (vermelho).



FONTE: Autoria própria.

Além das proporções de 1:1, também foi obtido sistemas em proporções 1:3 e 3:1 (BNZ:ZIF-8), porém a quantidade de fármaco incorporado a ZIF-8 nestas proporções foram menores que na de 1:1, devido a este fato os estudos seguiram apenas com os sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1).

A partir das curvas de incorporação foi possível observar que, passados 4 dias de agitação, o valor de incorporação do BNZ à ZIF-8 foi nulo para o sistema obtido em meio aquoso. O sistema obtido em acetona apresentou menor ponto de concentração no dia 4, totalizando, aproximadamente, 38% de incorporação. Os valores das concentrações iniciais e finais estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração inicial do BNZ e concentração analisada no momento da coleta (dia 4) com respectivo desvio padrão.

Sistema	Concentração inicial	Concentração média dia 4
BNZ:ZIF-8 (1:1)	($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Obtido em meio aquoso	15,00	15,23 \pm 0,29
Obtido em meio acetona	20,00	12,83 \pm 0,98

FONTE: Autoria própria.

Entretanto, este valor pode compreender não somente ao fármaco complexado à cavidade da ZIF-8, mas também aquele adsorvido à superfície da mesma. Dessa forma, visando corroborar o resultado obtido, foi realizada a redispersão do sistema em água. O objetivo deste passo foi corroborar o valor real de incorporação do fármaco à rede da ZIF-8, esperando-se que todo o BNZ fracamente adsorvido fisicamente a ZIF-8 fosse liberado devido a intensa força centrífuga aplicada. De fato, foi possível comprovar que, após a centrifugação, a quantidade de fármaco incorporado diminui, mas isso ocorre em pequena quantidade (3 a 4%).

Contudo, os experimentos demonstraram baixíssimo desvio padrão dos pontos isolados no tratamento estatístico, evidenciando a confiabilidade dos resultados. Em adição a este fato, foi padronizada a obtenção de sistema BNZ:ZIF-8 em acetona mediante agitação por 4 dias.

Com isso, a obtenção de novos sistemas foi realizada ao final do quarto dia de agitação intermitente, seguido de caracterização, a fim de corroborar a reprodutibilidade da obtenção de

sistemas com as mesmas propriedades físico-químicas, garantindo assim a produção continuada.

5.2 Caracterização do Benznidazol, Mistura Física e Sistemas microparticulados

A seguir, estão descritos os resultados obtidos e a respectiva discussão da caracterização físico-química dos materiais estudados.

5.2.1 Análise térmica

Estão descritos a seguir os resultados e respectiva discussão da análise térmica realizada no BNZ, ZIF-8, MF e sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1).

5.2.1.1 Termogravimetria (TG/DTG)

A curva TG do BNZ (Figura 14) evidenciou uma perda de massa de 1,62%, entre 30-105 °C referente ao teor de água presente na amostra. A degradação térmica do fármaco isolado foi observado em apenas um único evento (257,15-297,13 °C) ($DTG_{pico}=287,43$ °C). Foi verificada uma perda de massa de 45,66%.

Embora seja uma molécula híbrida, com uma porção orgânica, a curva TG da ZIF-8 (Figura 14) demonstrou a boa estabilidade térmica da molécula. Primeiramente, foi possível evidenciar a perda de massa de até 2,16% na faixa de temperatura entre 30 e 125 °C. Este valor pode estar relacionado à perda de moléculas de água presentes nas cavidades ou na superfície da ZIF-8 (AN; GEIB; ROSI, 2009). Até 460,40°C, há degradação de apenas 7% da massa inicial, o que evidencia a alta estabilidade térmica da ZIF-8. No intervalo de 535,69-578,16 °C foi possível observar uma perda de massa significativa – melhor evidenciada pela curva DTA – de 24,32%, relativo a degradação da porção orgânica da molécula, o imidazolato. A partir de então, a amostra apresenta decaimento lento, de baixa resolução, sem picos aparentes, sendo difícil identifica-los até mesmo pela curva DTG, provavelmente referentes a decomposição térmica da porção inorgânica da ZIF-8, até a formação de óxido de zinco (620,35-720,11 °C –

41,91% de perda de massa). Estes resultados estão em consonância com trabalhos anteriores de pesquisadores importantes na área (ALVES, 2013; LIU et al., 2011; ORDOÑEZ et al., 2010).

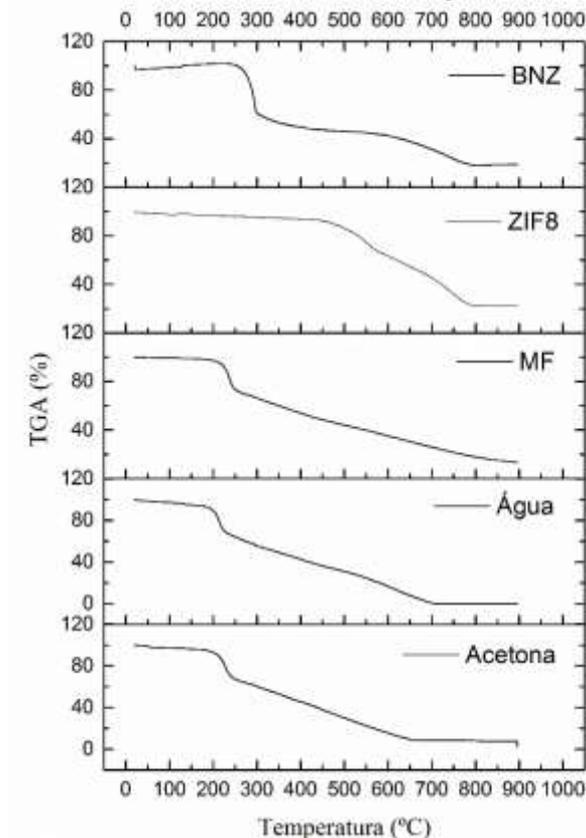
Na curva TG da MF BNZ:ZIF-8 1:1 (Figura 14) foi possível evidenciar a antecipação da degradação térmica do fármaco isolado, agora ocorrendo no intervalo entre 229,89-247,23 °C ($DTG_{pico}=238,04$ °C), subsequente a fusão do fármaco. Entretanto, foi observada uma redução significativa da perda de massa (24,49%), sugerindo uma possível proteção térmica devido a essa redução na perda de massa. Em relação a degradação da ZIF-8, o primeiro evento de degradação térmica – referente à degradação do imidazolato – foi observado em um intervalo bastante diferente do evidenciado para a ZIF-8 isolada (entre 410,89-448,54 °C), também apresentando a redução da perda de massa (11,55%). Este fato sugere que a interação física entre fármaco e ZIF-8 pode desestabilizar a porção orgânica desta última. Em seguida, foi observado o decaimento da curva TG até, aproximadamente, 975,07 °C correspondente ao óxido de zinco residual (36,78% de perda de massa).

A curva TG do sistema BNZ:ZIF-8 obtido em meio aquoso (Figura 14) evidenciou uma perda de massa de 4,17% entre 38,18-136,32 °C, referente a perda de água adsorvida e presente no interior da ZIF-8. É importante salientar que esse valor é, aproximadamente, o dobro do valor obtido para a ZIF-8 isolada, sugerindo que há mais moléculas de água neste sistema, o que pode acarretar no impedimento da entrada do BNZ. Também foi possível observar uma antecipação bastante pronunciada do evento relacionado à degradação do fármaco, demonstrando uma sobreposição ao pico relacionado à fusão do mesmo (214,65-234,64), acarretando uma perda de massa de 27,15%. Em relação a degradação da porção orgânica da ZIF-8, foi observado o mesmo valor de perda de massa (24,23%) no intervalo entre 392,28-438,55 °C. Posteriormente foi analisada a perda de massa de 32,68% referente à decomposição térmica da ZIF-8 à óxido de zinco. Pode-se observar que a formação do sistema antecipa os principais eventos de degradação da molécula, porém, reduz a porcentagem de massa decomposta, exceto ao se tratar da porção imidazolato.

Na análise do sistema BNZ:ZIF-8 1:1 obtido em meio de acetona (Figura 14), foi evidenciado um novo evento de perda de massa, entre 50,13-87,94 °C, com uma perda de massa de 1,97%. Provavelmente, este evento está relacionado a volatilização da acetona que ainda permanece no interior das cavidades da ZIF-8, uma vez que o decaimento pode ser observado desde a temperatura ambiente, tendo a acetona baixas pressão de vapor e ponto de ebulição. Este valor, ainda menor que o encontrado para a ZIF-8 isolada, ainda evidencia que há uma

menor quantidade de água (umidade) presente na cavidade da ZIF-8, e que esta, portanto, cede espaço para a ligação com as moléculas do fármaco. O restante da curva TG mostrou certa consonância com os resultados anteriores, provenientes da obtenção do sistema em meio aquoso. Foi observada uma antecipação da degradação térmica do fármaco em relação ao BNZ isolado (223,39-245,34 °C). Entretanto, foi observada uma redução ainda mais significativa da perda de massa (26,49%). Tal resultado corrobora o fato de que o sistema pode influenciar positivamente na estabilidade térmica do fármaco em relação ao mesmo isolado. A degradação da porção inorgânica da ZIF-8 ocorreu no intervalo entre 321,02-434,88 °C, com uma perda de massa de 16,15%; seguida da decomposição térmica até óxido de zinco (568,51-613,31 °C e 32,78% de perda de massa). Apesar de ter sido evidenciado que os valores de degradação da ZIF-8 foram antecipados, ambos mostraram uma redução significativa do teor decomposto. A diferença entre este perfil térmico e o evidenciado pela MF, pode ser um grande indicativo da real formação do sistema onde o fármaco está presente nas cavidades da ZIF-8.

Figura 14 – Curvas TG do BNZ, ZIF-8, MF e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

5.2.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva DSC do BNZ (Figura 15) apresentou pico endotérmico referente à fusão do fármaco bastante intenso e definido, na faixa de temperatura entre 190,04-194,36 °C ($T_{pico}=191,44$ °C) ($\Delta H=195,52$ mJ). Em seguida, foi observado o pico exotérmico relacionado à degradação do fármaco no intervalo entre 272,57-292,79 °C ($T_{pico}=286,90$ °C), o qual apresentou grande desprendimento de energia ($\Delta H=1,8$ J).

Na análise da curva da ZIF-8 (Figura 15) demonstra a ausência de picos, característica inerente a natureza híbrida da molécula. Por se tratar de uma molécula híbrida orgânica-inorgânica, os eventos de degradação da ZIF-8 foram analisados através da curva TG/DTA, que possibilitou o aquecimento da amostra até 900 °C podendo ser observada no Apêndice A. Nesta, foi possível observar dois eventos endotérmicos referentes à transição de fase: o primeiro entre 535,69-578,16 °C; e o segundo, entre 620,35-720,11 °C. Estes valores e respectivas perdas de massa estão descritas na discussão da curva TG da ZIF-8. Tal comportamento pode ser observado em materiais contendo zinco e resultados semelhantes foram discutidos por Blachnik e Siethoff (1996). As transições de fase sólido-sólido sugerem mudanças conformacionais das cadeias alquílicas, onde o número e a dimensão das transformações ocorrem em função do comprimento e do número dessas cadeias (BLACHNIK e SIETHOFF, 1996).

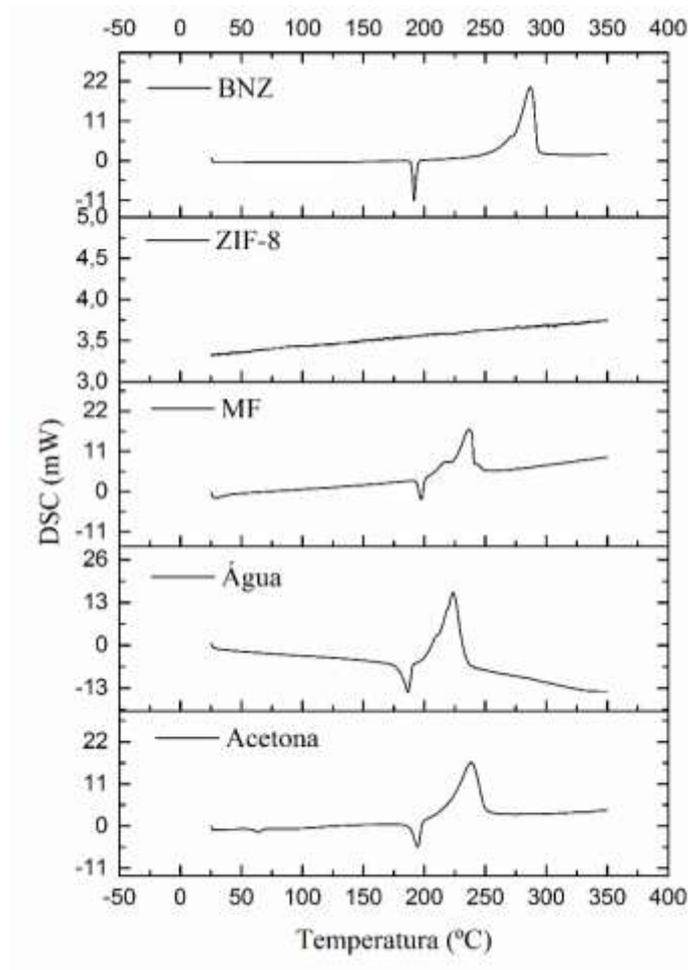
A partir da curva DSC da MF BNZ:ZIF-8 1:1 (Figura 15) foi possível evidenciar a antecipação do evento de fusão do fármaco (187,82-194,28 °C). Embora este fato possa identificar interações entre os componentes de uma formulação, a curva também evidenciou a redução da energia de entalpia referente ao evento ($\Delta H=195,52$ mJ). Este fenômeno é característico de materiais poliméricos, tais como: PEG, PVP, HPMC; que possibilitam o incremento da solubilidade do material, uma vez que há necessidade de uma menor quantidade de energia para solubilizar o fármaco. Tal comportamento já foi amplamente discutido por trabalhos anteriores do grupo (COSTA et al., 2013; LIMA et al., 2011). Dessa forma, fica claro que a simples mistura física promove a formação de uma interação fármaco-excipientes, mesmo sem ocasionar a formação propriamente dita da associação. Por outro lado, houve uma intensa antecipação do evento relacionado à degradação do fármaco ($T_{pico}=231,08$ °C), quase ocorrendo subsequente à fusão do mesmo, entretanto, houve menor desprendimento de energia ($\Delta H=1,09$ J).

Na curva DSC do sistema BNZ:ZIF-8 1:1 obtido em meio aquoso (Figura 15) foi visto a antecipação do evento de fusão (178,52-188,76 °C) ($T_{pico}=184,38$ °C), além da intensa redução da variação de entalpia ($\Delta H=472,73$ mJ), o que pode identificar o incremento da solubilidade do fármaco. Assim como na MF, o comportamento da grande antecipação da degradação do fármaco se repetiu, agora ocorrendo na faixa entre 212,57-231,28 °C ($T_{pico}=223,16$ °C), além de um aumento significativo da variação de energia despreendida ($\Delta H=2,14$ J).

Em relação a curva DSC do sistema BNZ:ZIF-8 1:1 obtido em acetona (Figura 15), foi possível observar um evento endotérmico entre 54,17-62,85 °C, referente à volatilização da acetona. Esse comportamento, diferente do apresentado na MF e no sistema obtida com água, pode caracterizar a formação do sistema microparticulado. Na fusão do fármaco foi observada uma antecipação bem mais discreta (184,44-192,91 °C) ($T_{pico}=189,97$ °C). Esta variação – de aproximadamente 2% – é descrita por muitos autores como uma faixa aceitável da compatibilidade entre componentes de uma mesma formulação (COSTA et al., 2013; FERRAZ, 2014; VIEIRA et al., 2013). Logo, este comportamento pode identificar que o sistema obtido em acetona é, de fato, mais eficiente no que tange a incorporação do fármaco. Entretanto, o valor para a variação de entalpia foi maior em comparação ao fármaco isolado ($\Delta H=261,25$ mJ), o que pode indicar que o sistema foi formado, uma vez que um novo perfil térmico foi evidenciado. Em relação à degradação do fármaco, o evento exotérmico foi antecipado (216,72-244,86 °C) ($T_{pico}=234,14$ °C), liberando uma energia de 1,8 J, exatamente idêntica a apresentada pelo fármaco isolado.

Todas as informações supracitadas mostram a importância da análise térmica como técnica de caracterização de sistemas *Drug Delivery*. Através das curvas TG/DTG, DTA e DSC foi possível corroborar o fato de que o sistema microparticulado obtido em acetona possibilitou a incorporação mais eficiente do fármaco, ora pela mudança do perfil térmico, ora pela compatibilidade entre os componentes utilizados.

Figura 15 – Curvas DSC do BNZ, ZIF-8, MF e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

5.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de infravermelho tem sido bastante utilizada para investigar possíveis interações entre fármaco e carreador nos sistemas, já que é capaz de detectar diferenças sutis na energia vibracional entre estado amorfo e cristalino (SATHIGARI et al., 2012; SHAH et al., 2013).

O espectro do BNZ (Figura 16) apresenta picos característicos, principalmente quando se leva em consideração as bandas típicas das amidas (vibração de estiramento N-H), estiramento de carbonila (banda amida I) e deformação N-H (banda amida II), além das

vibrações decorrentes dos grupos benzílico e imidazólico, e em particular, ao grupo nitro. A banda oriunda das vibrações de estiramento N-H, encontra-se em 3266 cm^{-1} , já a banda de estiramento da carbonila encontra-se em 1664 cm^{-1} e a deformação de N-H (amida II) em 1552 cm^{-1} , caracterizando a amida secundária. Além disso, a banda em 1292 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-N. O conjunto de bandas em $3033, 3068, 3112$ e 3269 cm^{-1} surgem das vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de metileno do grupo benzila e o estiramento dos C-H aromático, conforme demonstrado na figura 16. A região dos harmônicos e bandas de combinação (2000 a 1667 cm^{-1}), frequentemente útil na determinação do número e posição de substituintes em anéis aromáticos, parece pouco informativa no espectro, não sendo observadas as quatro bandas de pequena intensidade que caracterizariam o benzeno monossustituído presente na molécula. A banda em 1355 cm^{-1} é referente a vibração do estiramento simétrico do grupo nitro (ROLIM, 2010).

Analisando a Figura 16 referente a ZIF-8, constatamos em $3132, 2962$ e 2936 cm^{-1} estiramento C-H de compostos aromáticos, deformação axial assimétrica e estiramento de C-H de alifático referente ao anel imidazol, respectivamente. Em 1670 cm^{-1} é observada a banda do estiramento de C=C. Enquanto que as bandas de absorção C-N são observadas na região de 1100 a 1400 cm^{-1} . Finalizando, não foi possível observar o modo de estiramento Zn-N pois o mesmo ocorre no comprimento de onda entre 450 e 400 cm^{-1} e as análises só foram possíveis em equipamentos que trabalhavam com comprimentos até 600 cm^{-1} (PARK et al., 2006).

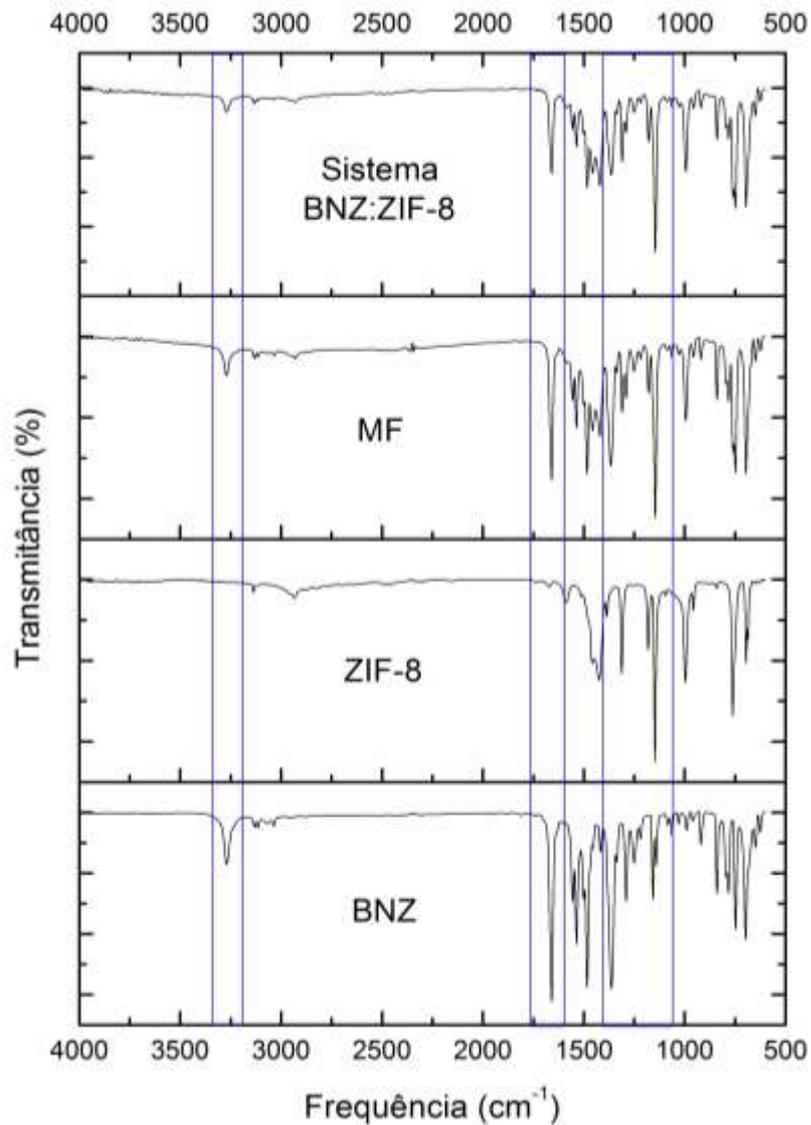
O espectro da MF (Figura 16) corresponde a sobreposição das bandas do BNZ e da ZIF-8, onde é possível notar a presença de picos característicos dos mesmos.

Em análise do sistema BNZ:ZIF-8 (1:1) (Figura 16), os picos do BNZ e da ZIF-8 não são favorecidos, devido a sobreposição dos mesmos. Entretanto, podemos sugerir a presença do fármaco em questão, em virtude de em 3266 cm^{-1} e 1292 cm^{-1} existir a ocorrência de uma deformação axial da ligação N-H e C-N, respectivamente. Em 1664 cm^{-1} há uma diminuição na intensidade na banda da carbonila, em 1355 cm^{-1} referente ao grupo nitro e 1552 cm^{-1} que corresponde a amida secundária a diminuição da intensidade dos picos também é observada. Adicionalmente, houve diminuição da intensidade da banda de absorção referente ao grupamento C-N da ZIF-8 (1400 e 1302 cm^{-1}), isto confirma que a mesma interage de maneira efetiva com BNZ.

Desta forma, ao comparar os espectros de infravermelho do sistema, da MF, e substâncias isoladas observa-se que o do sistema apresenta os principais picos em menor

intensidade, indicando, desta forma, que seja devido a obtenção do sistema, resultando em uma maior interação entre o BNZ e a ZIF-8 (GOMES, 2014).

Figura 16 – Espectros de infravermelho do BNZ, ZIF-8, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

5.2.3 Difractometria de Raios-X (DR-X)

O perfil difratométrico do BNZ (Figura 17) confirmou a natureza cristalina da amostra. Foi possível evidenciar numerosos picos de difração de alta intensidade, sendo os mais

característicos: 7,36; 16,78 e 21,86° 2 θ , além da presença de picos secundários. Estes dados estão em conformidade com estudos recentes do grupo (SANTOS et al., 2015).

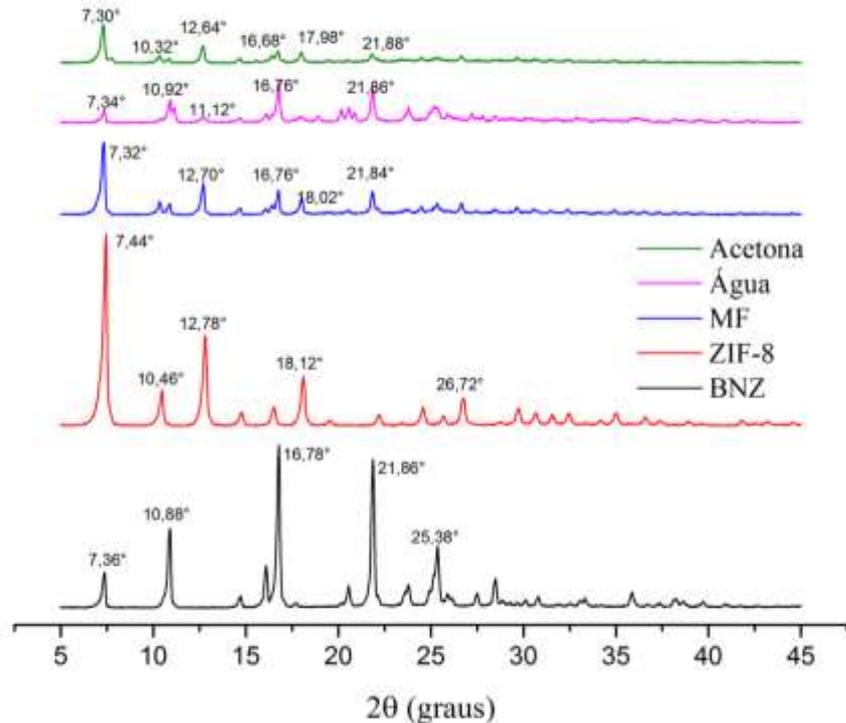
O DR-X da ZIF-8 (Figura 17) também determinou a característica cristalina da molécula, devido a presença de picos bastante intensos (7,44°) e outros de média intensidade (10,46 e 12,78°). Os picos 7,44; 10,46 e 12,78°, referentes a um cubo de corpo-centrado, correspondem às reflexões 011, 002 e 112. Tais dados foram utilizados para o cálculo do espaçamento basal, a fim de estabelecer um valor de referência para caracterizar a inserção da molécula de BNZ na ZIF-8. Estes resultados estão de acordo com trabalhos recentes (PAPPORELLO; MIRÓ; ZAMARO, 2015; PARK et al., 2006).

A MF entre BNZ e ZIF-8 na proporção 1:1 (p/p) (Figura 17) evidenciou um somatório dos perfis de ambos os componentes isolados, apresentando alguns dos seus picos característicos. Entretanto, o comportamento cristalino da ZIF-8 demonstrou-se mais evidente devido ao intenso pico em 7,44°, seguido de outros, relevantes no BNZ, porém apresentando-se com menor intensidade em relação ao fármaco isolado (16,78 e 21,86°).

O sistema BNZ:ZIF-8 na proporção de 1:1 (mol/mol) obtido em solvente aquoso apresentou perfil muito semelhante ao da MF. Entretanto, os picos característicos do BNZ são bem mais intensos que os da ZIF-8. Isto sugere que boa parte do BNZ está livre ou levemente adsorvido à ZIF-8, o que confirma a nulidade da formação do sistema, uma vez que para este sistema microparticulado o valor da eficiência de incorporação foi 0 (zero).

O sistema BNZ:ZIF-8 na proporção de 1:1 (p/p) (Figura 17) obtido através de agitação com acetona apresentou comportamento cristalino, resultando em somatório dos perfis difratométricos das substâncias isoladas. Porém, diferente da MF, os sistemas apresentaram os picos mais característicos do BNZ (7,36; 10,88; 16,78 e 21,86°), embora com uma intensidade média, em comparação com os perfis de DR-X isolados. Apesar de não se demonstrar amorfo, o DR-X diferentemente do visto para a MF, corrobora a formação do sistema, mesmo que este seja apenas caracterizado pela adsorção física do BNZ à superfície da ZIF-8. Outro fato importante deve ser levado em consideração: a redução da intensidade dos picos característicos do fármaco sugerem uma discreta perda da natureza cristalina da amostra. Para elucidar este fato, outras técnicas de caracterização foram realizadas.

Figura 17 – Difratoformas de raios-X do BNZ, ZIF-8, MF e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

Os valores do espaçamento basal foram utilizados como parâmetro de confirmação da inserção do fármaco à molécula da ZIF-8. Os valores maiores que o basal indicam que o fármaco foi inserido à molécula e, por isso, dilatam os espaços entre as lamelas. Entretanto, foi verificado o discreto aumento do tamanho do espaçamento basal quando se compara a ZIF-8 isolada à MF e os sistemas obtidos (Tabela 3), principalmente no pico de reflexão 011, o mais importante para a característica cristalina da ZIF-8. O fato corrobora a formação do sistema e sugere que este seja uma adsorção do fármaco a superfície da ZIF-8, caracterizando uma interação física, uma vez que o aumento do espaçamento basal é bem pequeno. Embora o sistema obtido em água também apresente acentuado aumento do espaçamento basal em todas as reflexões, como não foi observada a incorporação do fármaco, isto pode ser proveniente da inserção de moléculas de água entre as lamelas e não de fármaco, o que acaba por dilatar o espaço.

Tabela 3 - Cálculo do espaçamento basal dos picos de reflexão 011, 002 e 112 da ZIF-8, Mistura Física e Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8.

Amostra	Pico (°)	Reflexão	Espaçamento Basal (Å)
ZIF-8	7,44	011	11,87
	10,46	002	8,71
	12,78	112	6,94
MF BNZ:ZIF-8 1:1 (mol/mol)	7,32	011	12,04
	10,4	002	8,51
	12,70	112	6,97
BNZ:ZIF-8 1:1 (mol/mol)– Água	7,34	011	12,16
	10,92	002	8,11
	11,12	112	7,99
BNZ:ZIF-8 1:1(mol/mol) – Acetona	7,3	011	12,11
	10,32	002	8,10
	12,7	112	6,97

FONTE: Autoria própria.

5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

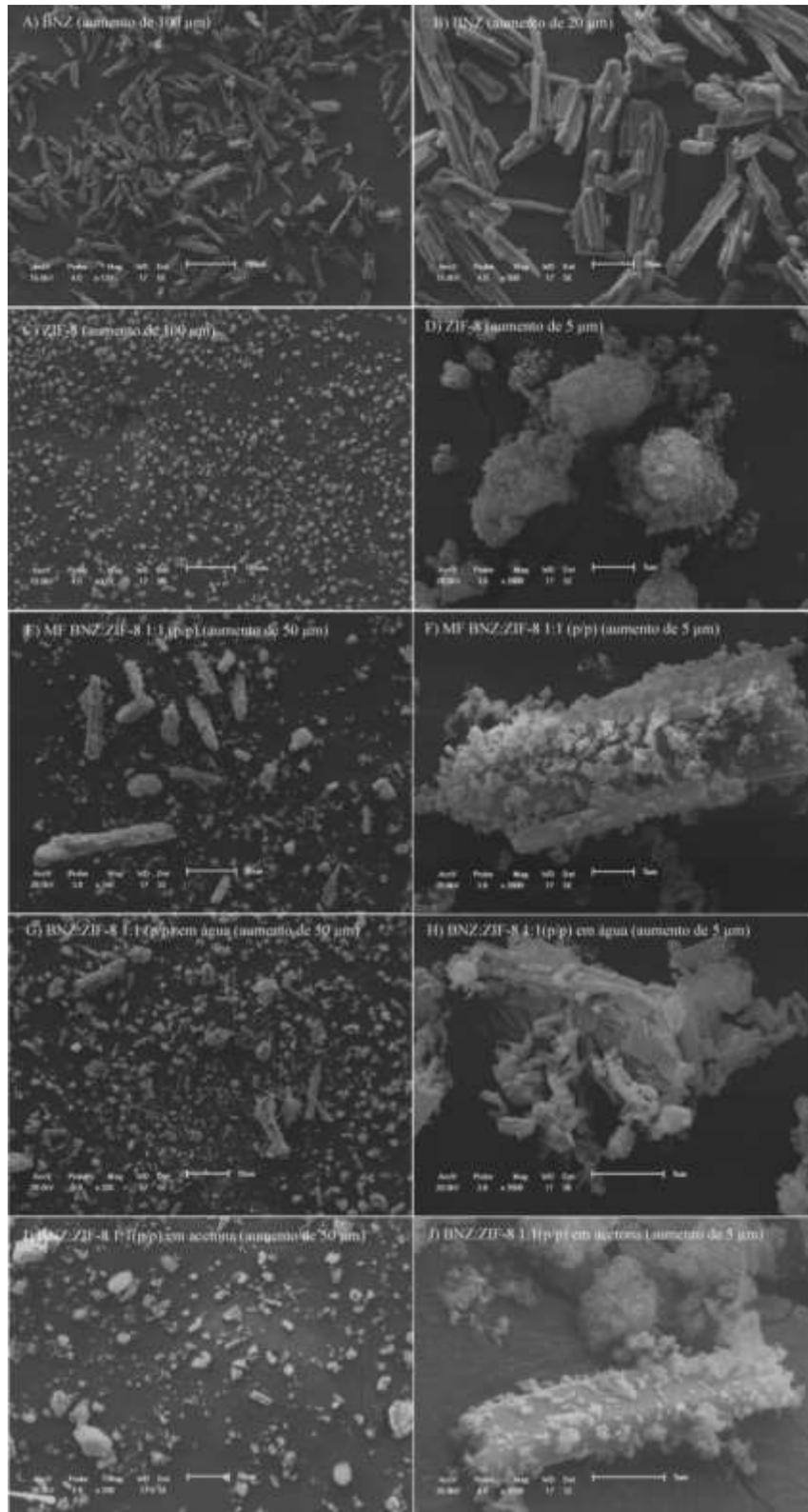
O MEV demonstrou o aspecto cristalino regular do BNZ (Figura 18.a-b) corroborando com o resultado do DR-X do fármaco. A maior parte dos cristais apresenta tamanhos irregulares de, aproximadamente, 100 µm. Os resultados estão em consonância com trabalhos prévios do grupo (SANTOS et al., 2015; SOARES-SOBRINHO, 2009).

A ZIF-8, também cristalina, demonstrou um aspecto rômbo do decaédrico uniforme (quase esférico) (Figura 18.c-d), bastante diminuto, acompanhada de agrupamentos de nanocristais – estando em consonância com outros estudos utilizando nano ZIF-8 (FANG et al., 2015).

A MF BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) confirmou a informação sugerida pelo DR-X acerca da adsorção física entre o fármaco e o excipiente. É possível observar a deposição dos cristais esféricos da ZIF-8 sobre a superfície dos regulares cristais de BNZ (Figura 18.e-f).

Em contrapartida, os sistemas oriundos do método de obtenção com solvente aquoso (BNZ:ZIF-8 1:1p/p) – e com acetona (BNZ:ZIF-8 1:1 p/p), evidenciaram a redução do tamanho e alteração da morfologia dos regulares cristais de BNZ (Figura 18.g-j). Embora ainda demonstrem a cristalinidade e a interação física de adsorção entre o fármaco e a ZIF-8, a redução do tamanho do cristal corrobora os resultados do DR-X no que tange a formação do sistema *drug delivery*. Além disso, isso pode indicar o incremento da solubilidade do BNZ, devido ao aumento da área de superfície e do conseqüente maior grau de solvatação do cristal do fármaco. Este incremento da solubilidade e da velocidade de dissolução podem ser confirmados através da elucidação da curva de DSC e do teste *in vitro* de dissolução do fármaco (WANG e SHMEIS, 2006).

Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Varredura: a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p); g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em meio aquoso; i) e j) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em acetona.



FONTE: Autoria própria.

5.2.5 Microscopia de luz polarizada

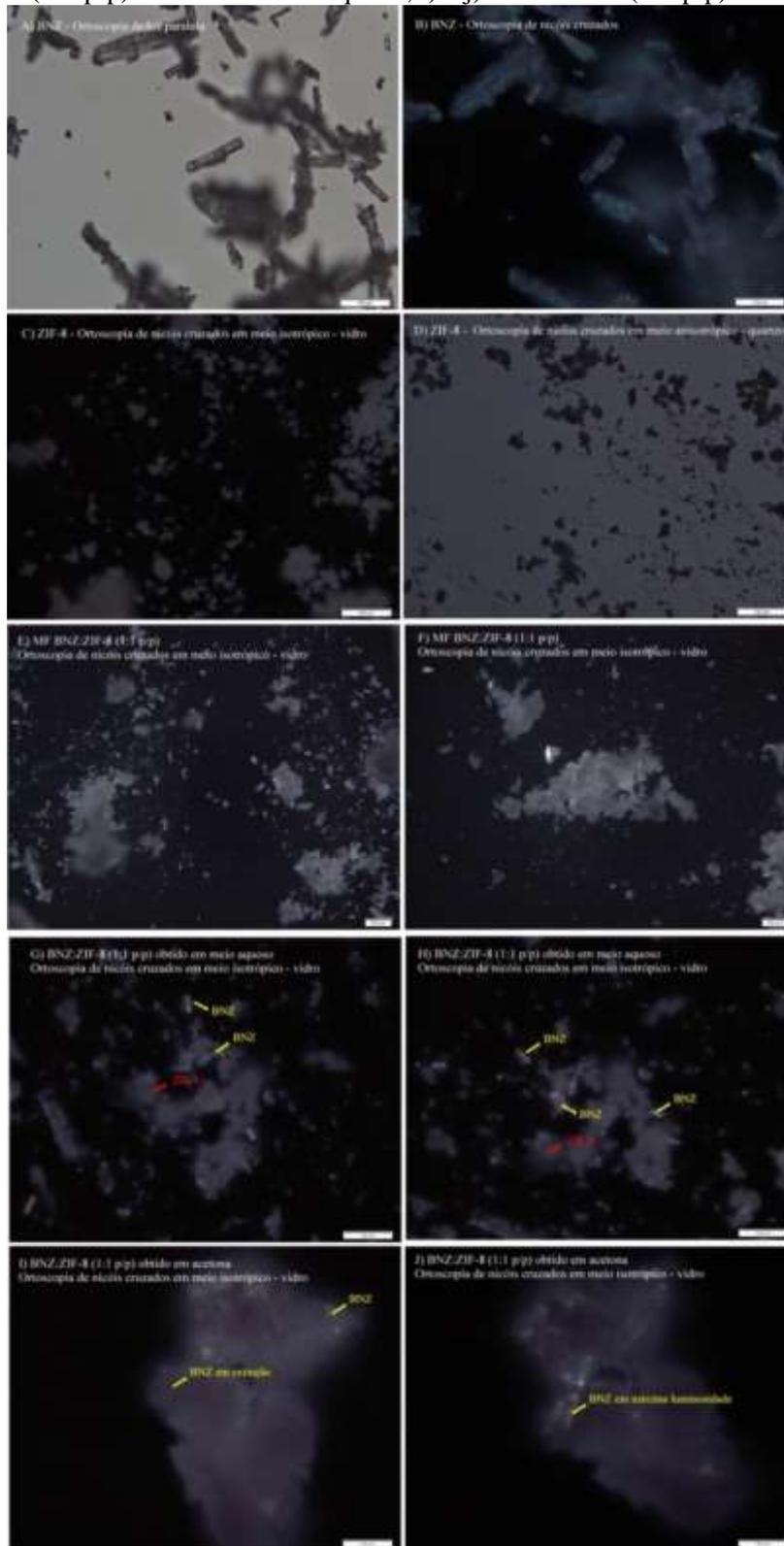
O BNZ foi observado em luz natural polarizada sob sistema de luz transmitida e mostrou transparência e forma de cristais prismáticos (Figura 19.a). Quando observado no sistema de iluminação ortoscópica com nicóis cruzados em luz transmitida polarizada foi colocada em um meio isotrópico (vidro) e os cristalitos de aspecto prismático a circular apresentaram um caráter anisotrópico, revelando a presença de posições de máximo aclaramento (cores de interferência) e posição de extinção (Figura 19.b). Este comportamento é típico de materiais cristalinos anisotrópicos (BIRREFRINGÊNCIA, 2014; WEAVER, 2003).

A amostra de ZIF-8 observada no sistema de iluminação de luz natural polarizada com luz transmitida, mostrou-se em pequenos grãos que se aglomeram e não transmitem perfeitamente a luz. Para a análise sobre luz polarizada e transmitida em ortoscópica com nicóis cruzados, a amostra também foi submetida à meios diferentes: isotrópico e anisotrópico, representados por vidro e quartzo, respectivamente. Em ambos os meios, os cristais apresentaram um caráter isotrópico e um aspecto de aglomeração, além de certa opacidade fazendo com que a luz não fosse transmitida em sua totalidade (Figura 19.c-d). Não apresenta máximo aclaramento e nem posições de extinção, de modo que, embora seja de natureza cristalina, assemelha-se ao comportamento de materiais isotrópicos e amorfos.

A MF BNZ:ZIF-8 (1:1) (Figura 19.e-f), como já esperado, apresentou os perfis anisotrópico e isotrópico do BNZ e da ZIF-8, respectivamente, corroborando com os resultados obtidos pelo MEV e evidenciando apenas a aderência física da ZIF-8 à superfície dos cristais do fármaco.

Os sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8 1:1 obtido em água e em acetona (Figura 19.g-j) demonstraram as mesmas características iniciais das amostras analisadas em isolado. Entretanto, o sistema obtido em acetona apresentou melhor resultado pois, na análise deste, o comportamento anisotrópico do BNZ foi pouco observado (BNZ quase em extinção), o que sugere que a natureza cristalina do fármaco foi reduzida, embora não o leve ao estado amorfo. O fato é corroborado pelas análises de MEV e indica que houve um incremento da solubilidade do fármaco, devido a transformação da sua estrutura cristalina. Isto, além de corroborar com as técnicas elucidadas até então, prova que a obtenção através de acetona possibilita a formação de sistemas mais homogêneos.

Figura 19 - Microscopia de Luz Polarizada: a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p); g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em meio aquoso; i) e j) BNZ:ZIF-8 (1:1 p/p) obtido em acetona.



FONTE: Autoria própria.

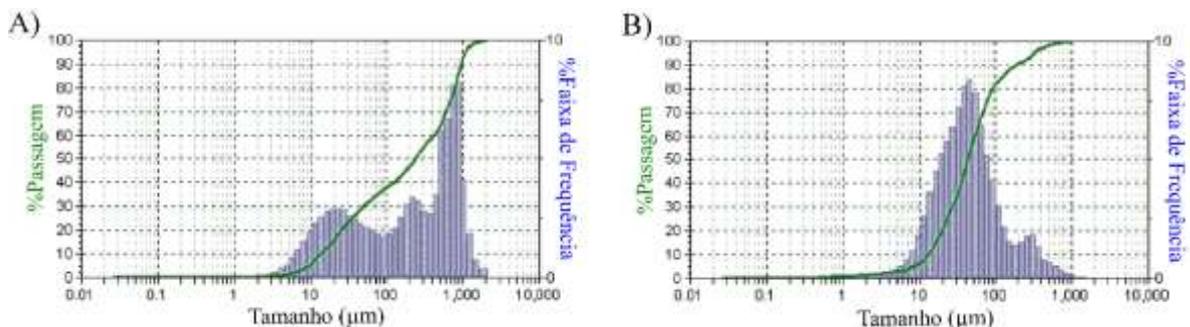
5.2.6 Tamanho de partícula por granulometria à laser e análise de área superficial, tamanho e volume de poros

Parâmetro de extrema importância no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, a área da superfície está intimamente relacionado com o tamanho da partícula e é diretamente ligada às velocidades de dissolução e absorção do fármaco.

Os gráficos da distribuição granulométrica das amostras de BNZ e ZIF-8 estão representados pelas Figuras 20.a-b. Os cristais de BNZ apresentaram tamanho de partícula entre 13 a 320 μm , com tamanho médio de partícula de 81 μm representado por mais de 80% da fração da amostra utilizada na análise. Ainda foi elucidada um valor de área superficial (Tabela 4) $S_{\text{BET}} = 0,298 \text{ m}^2/\text{mL}$. Estes valores corroboram sua lenta velocidade intrínseca de dissolução e justificam as deficientes propriedades de fluxo do mesmo (WEBB e ORR, 1997).

A ZIF-8 apresentou cristais de tamanho variando entre 13 e 1069 μm , com tamanho médio de partícula de 379 μm (equivalente a mais de 80% da fração analisada), com valor de área superficial $S_{\text{BET}} = 0,15 \text{ m}^2/\text{mL}$. Fazendo um comparativo com a metodologia descrita pela determinação da granulometria dos pós na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010).

Figura 20 - Gráfico de tamanho de partícula por granulometria à laser: a) BNZ e b) ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

As curvas de adsorção e dessorção indicam o tipo de porosidade do insumo farmacêutico (Tabela 4). O BNZ apresentou diâmetro médio de poro 47,65 \AA , sendo um indicativo da presença de mesoporos (poros de uma largura interior de 20 e 500 \AA), quanto ao volume destes poros mostraram-se reduzidos apresentando valor de 0,050 cm^3/g (WEBB e ORR, 1997). A ZIF-8 também demonstrou a presença de mesoporos (62,18 \AA) e um baixo volume de poro

(0,73 cm³/g). Trabalhos recentes mostram a consonância destes resultados (PARK et al., 2006). Contudo, Fang e colaboradores (2015) evidenciaram, através de isotermas de adsorção/dessorção de N₂, a presença de microporos na ZIF-8, devido ao rápido aumento do volume de adsorção em baixa pressão relativa, sendo os mesoporos mais predominantes. A MF BNZ:ZIF-8 (1:1) e o sistema BNZ:ZIF-8 (1:1) apresentaram respectivamente diâmetros de poro 42,46 Å e 43,82 Å, mantendo-se com estrutura mesoporosa, e volume de poros 1,065 cm³/g e 0,602 cm³/g. Esses resultados evidenciam o êxito na obtenção do sistema, pois a redução no tamanho de poro do sistema em relação a ZIF-8 comprovam a presença de molécula de BNZ na estrutura porosa, interagindo através de forças com a ZIF-8 diminuindo assim o seu tamanho que de 62,18 Å passou a ser 43,82 Å (CARMIGNAN, 2006).

Tabela 4 - Análise granulométrica e da área superficial, tamanho e volume de poros do BNZ e da ZIF-8.

Amostra	Área de Superfície Específica (S_{BET}) (m²/mL)	Área de Superfície (método BET) (m²/g)	Volume de Poro (método BJH) (cm³/g)	Tamanho do Poro (método BJH) (Å)
BNZ	0,30	56,18	0,050	47,65
ZIF-8	0,15	1386,69	0,73	62,18
MF	-	-	1,065	42,46
Sistema	-	-	0,602	43,82

FONTE: Autoria própria.

5.2.7 Ensaio quantitativo de solubilidade

A solubilidade dos fármacos é uma propriedade que influencia diferentes aspectos relativos à absorção, pois apenas o fármaco dissolvido é capaz de ser absorvido. Auxilia também na escolha do solvente mais adequado para utilizações analíticas.

Notam-se algumas diferenças dos resultados deste ensaio (Tabela 5) com respeito aos valores de solubilidade descritos na literatura. A solubilidade aquosa do BNZ é citada em algumas publicações como 0,4 mg/mL, afastando-se consideravelmente do valor experimental encontrado de 0,2 mg/mL em água, porém, os resultados encontrados nesse trabalho são os

mesmos encontrados na Farmacopéia Brasileira 5ª edição, confirmando a característica muito pouco solúvel do BNZ em relação a água. Este dado demonstra que o fármaco não se ioniza nas condições avaliadas, o que já era esperado, uma vez que a molécula de BNZ não apresenta grupos facilmente ionizáveis.

Tabela 5 - Solubilidade média de BNZ em água em diferentes dias.

Dias	Solubilidade (mg/mL)
1	0,216 ± 0,77
4	0,214 ± 2,30
7	0,225 ± 0,83

FONTE: Autoria própria.

5.3 Estudos dos perfis de dissolução *in vitro*

Estão descritos a seguir os resultados obtidos e sua discussão no que tange os perfis de dissolução do BNZ, MF e Sistema microparticulado.

5.3.1 Tratamento de dados

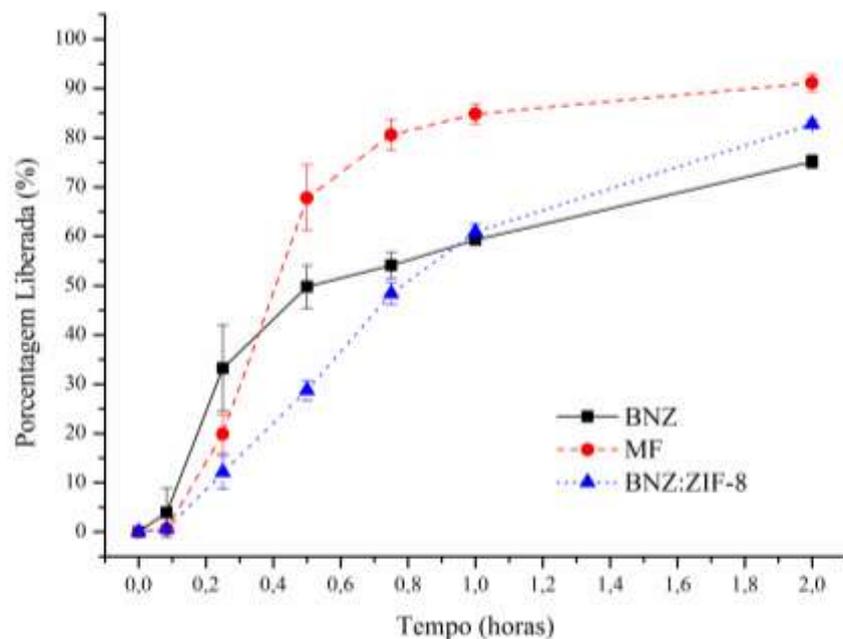
Os estudos de dissolução são uma importante ferramenta de controle de qualidade nas várias etapas dos processos de desenvolvimento de fármacos. Estes estudos são realizados geralmente em condições *sink*, que preconiza a utilização de um volume do meio de dissolução com no mínimo três vezes o necessário para formar uma solução saturada do fármaco (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; ROSA, 2005; STORPIRTIS et al., 2011).

Neste trabalho, amostras que apresentavam quantidades equivalentes a 36,66 mg de BNZ foram utilizadas nos estudos de dissolução, significando que, se completamente dissolvido num volume de 500 mL apresentará uma concentração igual a 73µg/mL, estabelecendo, desta forma, a condição *sink*.

Os perfis de dissolução do BNZ isolado, da MF e do sistema BNZ:ZIF-8 (1:1), sob condições *sink* estão exibidos na Figura 21 (pH 4,5) e 22 (pH 7,6). A Figura 23 exibe a comparação dos perfis de dissolução dos sistemas nos diferentes pH's.

A Figura 21 demonstra que em pH 4,5 o BNZ isolado possui baixa porcentagem de fármaco liberado, sendo uma boa parte já dissolvida no início da dissolução. Já a MF consegue alcançar uma porcentagem de liberação de 80% em 45 minutos, adequando-se a uma liberação convencional. O sistema BNZ:ZIF-8 (1:1) mostrou certa modulação da liberação do fármaco, que ocorre mais lenta ao longo do tempo. Entretanto, a liberação do fármaco atingiu 83% de BNZ liberado em 2 horas. Segundo Zhuang e colaboradores (2014), este resultado é proveniente da dissociação das redes de coordenações da ZIF-8 em pH ácidos, fazendo com que a rede se desintegre e o fármaco seja liberado rapidamente. Ainda assim, foi possível observar o incremento da solubilidade do BNZ, visto que, em duas horas, a porcentagem de BNZ isolado dissolvido foi cerca de 75%.

Figura 21 – Perfil de dissolução do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 (1:1) em pH 4,5.

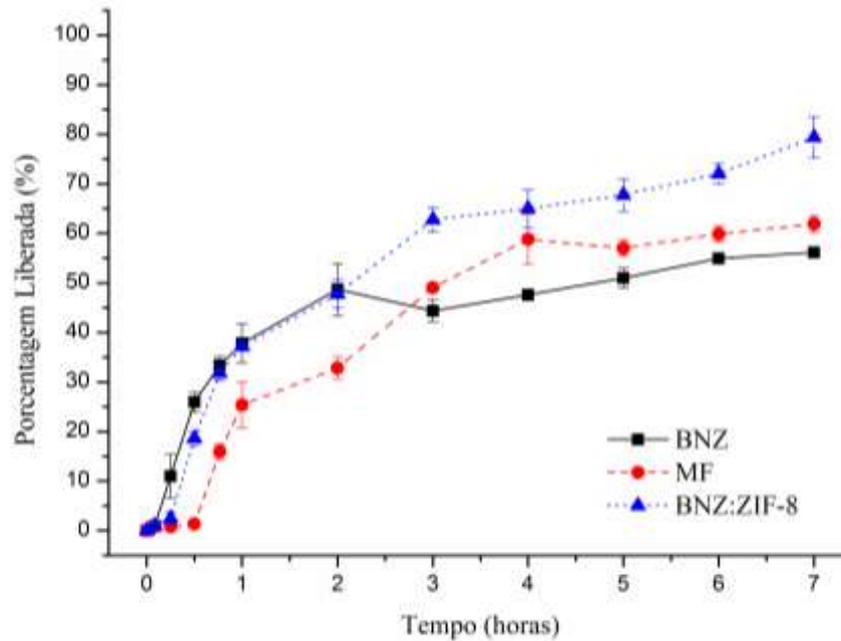


FONTE: Autoria própria.

Em paralelo, nos resultados contidos na Figura 22 verifica-se que em meio com pH 7,6 o sistema obteve porcentagens de liberação superior ao BNZ isolado. Nos primeiros 30 minutos de dissolução é possível identificar que o BNZ isolado começa a obter uma alta taxa de liberação, enquanto a MF e o sistema seguram mais o fármaco. Daí em diante ocorre uma rápida liberação do BNZ. Nestes resultados também foi visto que a MF se comportou com uma

liberação gradual a medida que o tempo aumentava. Entretanto, a associação modulou a liberação do fármaco de uma maneira mais equilibrada, sem oscilações de concentração onde, em 7 horas atingiu o ponto máximo de liberação de cerca de 80% do fármaco, muito maior que a MF (61%) e o BNZ (56%) isolado, corroborando o incremento de solubilidade do mesmo.

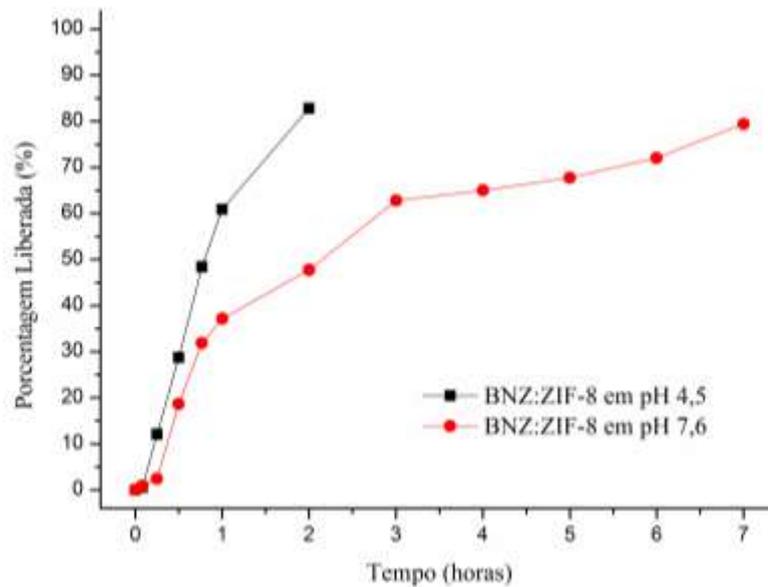
Figura 22 – Perfil de dissolução do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 (1:1) em pH 7,6.



FONTE: Autoria própria.

Sendo assim, os resultados da Figura 23 demonstram que em pH 4,5 a estrutura da ZIF-8 se rompe rapidamente liberando uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo. Já em meio com pH 7,6, a liberação de BNZ do sistema se dá de forma controlada, aumentando gradualmente de acordo com os intervalos de tempo, o que torna o trabalho ainda mais interessante, pois enquanto permanece na corrente sanguínea – onde o pH varia entre 7,35-7,45 – o sistema libera controladamente o fármaco, porém, quando em contato com as células infectadas pelo *T. cruzi* – cujo pH é próximo a 5 – o sistema libera o BNZ rapidamente. Fica notório que, então, teve-se o desenvolvimento de um sistema *Drug Delivery* do BNZ às células infectadas pelo parasita.

Figura 23 – Perfil de dissolução do Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 (1:1) em pH 4,5 e 7,6.



FONTE: Autoria própria.

Os resultados dos perfis de dissolução são confirmados quando analisadas a ED% (Tabela 6), onde o BNZ apresenta valores mais altos de eficiência nos primeiros tempos de análise, enquanto os sistemas se mostram com baixa eficiência no início, porém, no decorrer do tempo esta é elevada. Confirmando a eficácia do sistema desenvolvido no tocante da modulação da liberação do fármaco e a obtenção de incremento de solubilidade do mesmo.

Tabela 6 – Eficiências de dissolução obtidas a partir do perfil de dissolução do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 (1:1).

	ED _{0,25}	pH 4,5	
		ED _{0,75}	ED ₂
Benznidazol	0,091	0,322	0,493
Mistura Física	0,057	0,406	0,695
Sistema	0,035	0,190	0,528
pH 7,6			
	ED _{0,25}	ED ₂	ED ₇
Benznidazol	0,041	0,324	0,430
Mistura Física	0,006	0,164	0,448
Sistema	0,012	0,284	0,540

FONTE: Autoria própria.

A partir deste estudo, os valores da área sob a curva (AUC) foram calculados e, assim, suas respectivas médias estão representadas nas Tabelas 7 e 8. Estes valores representam a manutenção da supersaturação, que é alcançada através das interações físicas e/ou químicas entre o carreador e as moléculas do fármaco que, assim, inibem a sua precipitação e proporcionam aumento dos seus níveis em solução, garantindo melhora da sua biodisponibilidade (DINUNZIO et al., 2008; SUN; JU; LEE, 2012).

Os resultados contidos na Tabela 7 demonstram que a AUC da maioria das MF em pH 4,5 foram superiores ao do BNZ isolado. Além disso, comparando a AUC das MF e BNZ com a do sistema, mantendo a mesma proporção de BNZ, observa-se que os valores dos sistemas são sempre mais baixos, o que corrobora os resultados do perfil de dissolução no que tange a modulação da liberação do fármaco.

Tabela 7 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 (1:1) em pH 4,5.

Tempo (horas)	AUC (min.µL/mL) em pH 4,5		
	BNZ	MF	Sistema BNZ:ZIF-8
0,083	0,16	0,02	0,02
0,25	2,29	1,44	0,87
0,5	11,23	11,96	5,51
0,75	24,22	30,51	14,29
1	38,39	51,19	27,10
2	105,63	139,18	98,62

FONTE: Autoria própria.

Paralelamente, verificou-se que em pH 7,6 (Tabela 8), até as três primeiras horas, o sistema obteve valores de AUC inferiores ao BNZ isolado, evidenciando a modulação da liberação do fármaco, dando-se esta de maneira prolongada. Após esse tempo, são observados valores significativamente superiores aos apresentados pelo fármaco isolado, mostrando o êxito do sistema em incrementar a solubilidade do BNZ.

Sugere-se que este resultado se dê devido a estabilização da dissolução do fármaco. Como evidenciado pelo MEV e demais caracterizações, no sistema, o BNZ se recristaliza em tamanho inferior quando comparado ao fármaco isolado. Isto aumenta a capacidade de

dissolução do mesmo. Ainda que mostre resultados satisfatórios de incremento de solubilidade em ambos os pH testados, em pH 7,6 o prolongamento da liberação do BNZ é mais acentuado visto que, em pH ácido a ZIF-8 perde sua estrutura muito rapidamente.

Tabela 8 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e Sistema microparticulado BNZ:ZIF-8 (1:1) em pH 7,6.

Tempo (horas)	AUC (min.µL/mL) em pH 7,6		
	BNZ	MF	Sistema BNZ:ZIF-8
0,083	0,03	0,03	0,03
0,25	1,02	0,15	0,31
0,5	5,64	0,41	3,04
0,75	13,46	2,71	9,77
1	21,68	7,52	17,12
2	64,93	32,96	56,90
3	110,80	70,25	110,50
4	156,12	124,17	172,73
5	205,41	182,08	239,10
6	258,36	240,53	305,84
7	313,90	301,42	378,40

FONTE: Autoria própria.

5.3.2 Modelos cinéticos

Os modelos cinéticos testados tiveram números de parâmetros diferentes, o que pode aumentar o valor de R^2 devido a sobreajustes que podem ocorrer. Enquanto o $R^2_{ajustado}$ tende a diminuir esse sobreajuste sendo, portanto, o coeficiente utilizado para a escolha do melhor modelo (ZHANG et al., 2010).

Para a dissolução em pH 4,5 (Tabela 9) os melhores modelos cinéticos para o sistema foram: Primeira Ordem > Peppas-Sahlin > Korsmeyer-Peppas > Ordem zero > Higuchi. Já em pH 7,6 o sistema obedeceu aos modelos cinéticos na seguinte ordem: Peppas-Sahlin > Primeira Ordem > Korsmeyer-Peppas > Higuchi > Ordem zero.

Tabela 9 – Coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8 em diferentes pH's.

Modelos	pH 4,5		pH 7,6	
	R^2	$R^2_{ajustado}$	R^2	$R^2_{ajustado}$
Ordem zero	0,933	0,916	0,845	0,827
Primeira ordem	0,995	0,993	0,930	0,922
Higuchi	0,924	0,905	0,872	0,857
Korsmeyer- Peppas	0,967	0,956	0,908	0,889
Peppas-Sahlin	0,993	0,986	0,981	0,971

FONTE: Autoria própria.

Os modelos de primeira ordem e Peppas-Sahlin foram, então, os escolhidos pelo sistema, segundo o $R^2_{ajustado}$. No modelo de primeira ordem, a velocidade de dissolução das partículas sólidas em um meio líquido depende da relação quantidade dissolvida de fármaco e quantidade remanescente deste no carreador, de modo que a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo ao longo tempo. Esse é um modelo que pode ocorrer em liberações prolongadas, mas está principalmente relacionado as liberações convencionais, o que confirma a rápida desintegração da rede organometálica em pH 4,5, liberando grande parte do BNZ em pouco tempo de ensaio. Em relação ao modelo Peppas-Sahlin, esse se adequa as liberações controladas, onde suas constantes K_1 e K_2 (Tabela 10) representam, respectivamente, a influência da difusão e do relaxamento do carreador na libertação do fármaco. O valor maior encontrado foi o de K_1 significando a maior influência e atuação da difusão na libertação do fármaco do que o próprio relaxamento da rede organometálica, sendo então a libertação do mesmo pela difusão (PEPPAS e SAHLIN, 1989).

Um outro modelo utilizado para corroborar e complementar os resultados obtidos por Peppas-Sahlin é o de Korsmeyer-Peppas onde calcula-se n (coeficiente de libertação) através de sua equação, utilizando-o para interpretar e descrever a libertação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte de fármaco que obedece as leis de Fick ou transporte Fickiano, e outro em consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento. Nas condições de dissolução estudadas, o n (obtido da equação de regressão linear) está acima de 1 (Tabela 10), classificando-se como caso II de transporte, onde a taxa de difusão é superior

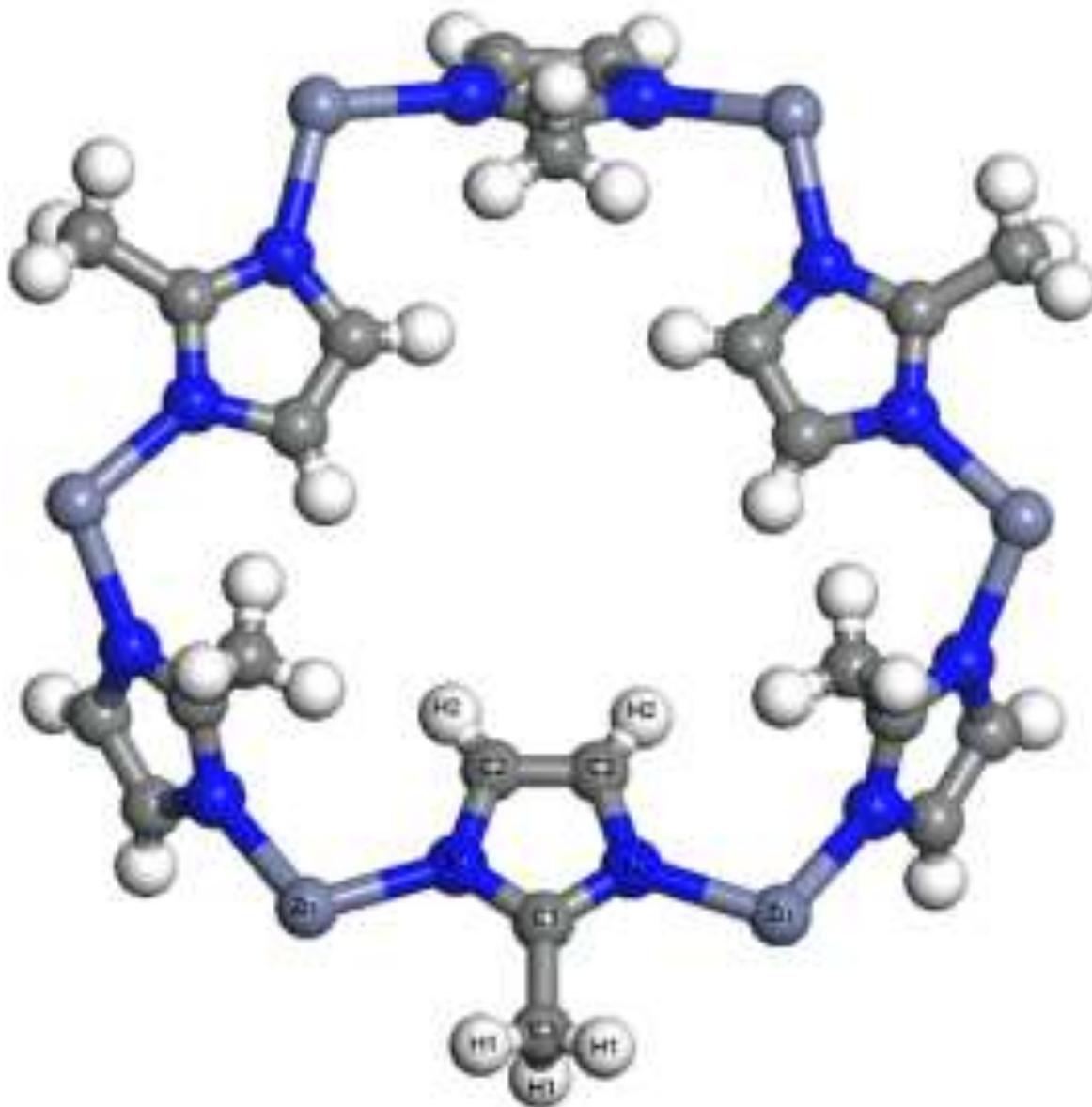
a de relaxamento, o que confirma os resultados obtidos pelo modelo de Peppas-Sahlin (COELHO, 2007; KORSMEYER et al., 1983).

Observando os resultados obtidos pode-se evidenciar que o fármaco é liberado ligeiramente em ambiente acidificado (devido a dissociação da rede de coordenação), funcionando o sistema como uma liberação convencional. Em contrapartida, em pH mais elevado (pH 7,6) é possível observar uma menor liberação, visto que a mesma nesse ambiente é mais lenta, onde o fármaco é liberado aos poucos por difusão, não deixando de ser possível que uma pequena parcela desta liberação se dê pelo relaxamento (respiração) da rede organometálica. Consequentemente, a incorporação do BNZ à ZIF-8 pode, de fato, aumentar a biodisponibilidade do fármaco, reduzir a incidência de efeitos colaterais sistêmicos do mesmo e funcionar como *Drug Delivery* às células infectadas pelo parasita na doença de Chagas.

Tabela 10 – Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando Sistemas microparticulados BNZ:ZIF-8 em diferentes pH's .

Modelos	pH 4,5		pH 7,6	
	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂
Peppas-Sahlin	1,78	-1,14	1,41	1,14
	n		n	
Korsmeyer-Peppas	1,86		1,25	

FONTE: Autoria própria.

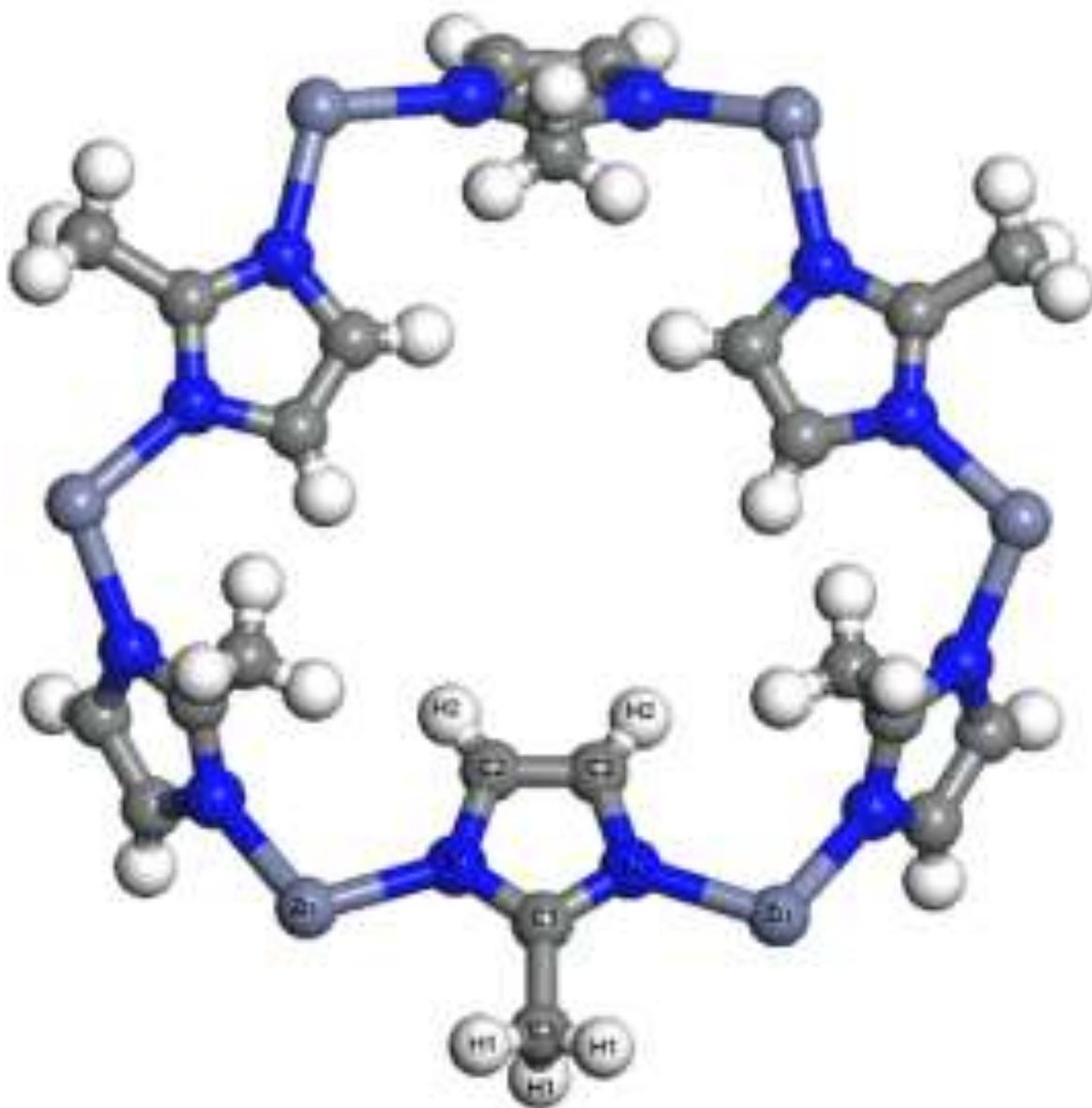


CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Através da análise das proporções de BNZ e ZIF-8 e também dos solventes utilizados, foi possível selecionar e obter misturas físicas e sistemas microparticulados com boa porcentagem de incorporação, tendo o sistema obtido com solvente acetona uma maior porcentagem, de aproximadamente 38%;
- ✓ Por meio da técnica de DR-X observou-se que, apesar de se demonstrar sem forma definida, o difratograma diferentemente do visto para a MF, corroborou com a formação do sistema, mesmo que tenha sido apenas caracterizada pela adsorção física do BNZ à superfície da ZIF-8;
- ✓ Na análise da microscopia eletrônica de varredura, foi visualizada ainda a cristalinidade e a interação física de adsorção entre o fármaco e a ZIF-8, porém houve redução do tamanho do cristal. Além disso, indicou o incremento da solubilidade do BNZ, devido ao aumento da área de superfície e do consequente maior grau de solvatação do cristal do fármaco;
- ✓ A microscopia de luz polarizada demonstrou que o sistema 1:1 obtido em acetona apresentou melhor resultado, pois o comportamento anisotrópico do BNZ foi pouco observado, o que sugeriu que a natureza cristalina do fármaco foi reduzida, embora não tenha levado ao estado amorfo;
- ✓ Ainda foi possível através das análises de TG e DSC avaliar a influência que a ZIF-8 exerce sobre o BNZ, caracterizada pelas alterações sobre o seu comportamento térmico. Embora tenha mostrado antecipação dos valores de degradação, o sistema apresentou redução da porcentagem de perda de massa;
- ✓ O ensaio de dissolução *in vitro*, sob condições sink demonstrou que, em pH 4,5, a estrutura da ZIF-8 se rompe rapidamente liberando uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo (2h). Já em meio com pH 7,6, a liberação de BNZ do sistema microparticulado 1:1 ocorreu de forma controlada, aumentando gradualmente de acordo com os intervalos de tempo, liberando 80% do fármaco após 7h;
- ✓ No estudo de dissolução em pH 7,6, o sistema BNZ:ZIF-8 (1:1) obtido com acetona apresentou maiores valores de AUC que o BNZ e a MF, evidenciando uma melhor resposta quanto à melhora da solubilidade e controle da liberação do fármaco nesse pH;

- ✓ Através do ajuste dos perfis de dissolução a alguns modelos cinéticos, foi possível confirmar o comportamento dos sistemas nos diferentes pH's onde em pH 4,5, o modelo que melhor se adequou foi o de primeira ordem, já em pH 7,6 foi o de Peppas-Sahlin. Sendo assim, quando na corrente sanguínea –onde o pH varia entre 7,35-7,45 – o sistema libera controladamente por difusão o fármaco, porém, quando em contato com as células infectadas pelo *T. cruzi* – cujo pH é próximo a 5 – o sistema microparticulado libera o BNZ rapidamente. Fica notório que, então, teve-se o desenvolvimento de uma vetorização do BNZ às células infectadas pelo parasita, além de uma melhora da sua biodisponibilidade;
- ✓ Com base nos resultados obtidos, será realizada a obtenção tecnológica de novos sistemas, utilizando como alternativa de secagem o spray dryer, além do uso de outros solventes e fármacos, sendo caracterizada a interação entre este e a ZIF-8 por meio do estudo de *docking* a nível molecular;
- ✓ Será realizada a obtenção tecnológica de uma forma farmacêutica à base do sistema BNZ:ZIF-8 para o tratamento alternativo da doença de Chagas, seguido dos controles de qualidade pertinentes;
- ✓ Após a obtenção tecnológica da forma farmacêutica, será desenvolvido método indicativo de estabilidade e estudo de estabilidade acelerada e de longa duração do benznidazol matéria-prima – conforme a normativa da RDC 45/2012 – e da forma farmacêutica obtida – conforme a normativa RE 01/2005.



REFERÊNCIAS

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

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). **Acta Trop.**, v. 110, p. 159-177, 2009.

ALVES, I. B. V. **Metal-Organic Frameworks (MOFs): alternativa inteligente para carreamento de fármacos anti-inflamatório e antineoplásico.** 2013. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

ALVES, L. D. S. **Desenvolvimento de dispersões sólidas binárias visando o incremento da solubilidade aquosa do antirretroviral efavirenz.** 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Programa de Pós-Graduação em Inovação terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

AMIRILARGANI, M.; SADATNIA, B. Poly (vinyl alcohol) /zeolitic imidazolate frameworks (ZIF-8) mixed matrix membranes for pervaporation dehydration of isopropanol. **Journal of Membrane Science**, v. 469, p. 1-10, 2014.

AN, J.; GEIB, S. J.; ROSI, N. L. Cation-Triggered Drug Release from a Porous Zinc - Adeninate Metal-Organic Framework. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 24, p. 8376–8377, 2009.

ANI, N. B. C. **Structural Evaluation of Zeolite Imidazolate Framework 8 (ZIF-8) Nanoparticles as Adsorbent for Carbon Dioxide Removal.** 2013. 58 f. Dissertação (Bacharelado em Engenharia Química) - Programa de Engenharia Química, Universidade de Tecnologia de Petronas, Tronoh, 2013.

ARAÚJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina.** 2003. 241 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ARONSON, H. Correction factor for dissolution profile calculations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1190, 1993.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 12-21, 2007.

BARZEGAR-JALALI, M. et al. Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium–eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. **Powder Technology**, v. 219, p. 211-16, 2012.

BESTETTI, R. B.; MARTINS, C. A.; CARDINALLI-NETO, A. Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879-1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). **Int. J. Cardiol.**, v. 134, p. 9-16, 2009.

BIRREFRINGÊNCIA. In Infopédia. Porto: Porto Editora, 2003-2014. Disponível em : <[http://www.infopedia.pt/\\$birrefringencia](http://www.infopedia.pt/$birrefringencia)>. Acesso em: 24 ago. 2015.

BLACHNIK, R.; SIETHOFF, C. Thermoanalytical and X-ray study of some alkylammonium tetrachlorozincates. **Thermochimica Acta**, v. 278, p. 39-47, 1996.

BRENER, Z. **Trypanosoma cruzi**: morfologia e ciclo evolutivo. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/nf9bn/pdf/dias-9788575412435-03.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2015.

BRENER, Z. et al. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BUSTAMANTE, E. L.; FERNÁNDEZ, J. L.; ZAMARO, J. M. Influence of the solvent in the synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) nanocrystals at room temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 424, p. 37-43, 2014.

CANEVAROLO-JÚNIOR, S. V. et al. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2003. 448 p.

CARMIGNAN, F. **Desenvolvimento de microesferas de ibuprofeno a partir dos biopolímeros polihidroxicanoatos. Estudo da influência das características físico-químicas das microesferas sobre o perfil de liberação do fármaco e degradação das partículas**. 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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

CASTRO, J. A.; MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.

COELHO, P. M. B. S. **Desenvolvimento de formulações de liberação modificada de ranitidina**. 2007. 264 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade de Porto, Portugal, 2007.

COSTA, O. V. **Multiplicidade estrutural no paracetamol no estado sólido**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) – Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, 2009.

COSTA, S. P. M. et al . Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta (Print)**, v. 562, p. 29-34, 2013.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R. C.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, p. 6-7, 2010.

CUFFINI, S. L. et al. Physicochemical characterization of deflazacort: Thermal analyses, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, p. 261-269, 2007.

CUNDY, C. S. ; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: history and development from the earliest days to the present time. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 663-702, 2003.

CUNHA, D. P. **Redes de Coordenação: Novos Sistemas Carreadores de Fármacos**. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

CUNHA, V.R. R. et al. Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 159-171, 2010.

DINUNZIO, J. C. et al. Amorphous compositions using concentration enhancing polymers for improved bioavailability of itraconazole. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 6, p. 968-980, 2008.

FANG, M. et al. ZIF-8/PDMS mixed matrix membranes for propane/nitrogen mixture separation: Experimental result and permeation model validation. **Journal of Membrane Science**, v. 474, p. 1-41, 2015.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 1-2, 2010, 545p.

FERRAZ, L. R. M. **Aplicação de *Quality by Design* no estudo de pré-formulação farmacêutica do sulfato de hidroxicloroquina**. 2014. 200 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

FERREIRA, F. R. **Síntese, caracterização e aplicação biológica de hidroxiapatita: em presença de gelatina e associada a sulfato de gentamicina**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2009.

GADIPELLI, S. et al. A thermally derived and optimized structure from ZIF-8 with giant enhancement in CO₂ uptake. **Energy Environ. Sci.**, v. 7, p. 2232-2238, 2014.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009.

GARCÍA-ARIETA, A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 89-97, 2014.

GASCÓN, J. et al. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. **Rev Esp. Cardiol.**, v. 60, n. 3, p. 285-293, 2007.

GIL, E. S. et al. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. 485 p.

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

GOMES, T. A. **Obtenção e caracterização de dispersões dólidas para o incremento da solubilidade do Efavirenz na terapia anti-HIV**. 2014, 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

HE, M. et al. Facile synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 from a concentrated aqueous solution. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 184, p. 55-60, 2014.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de Liberação Controlada. **Pharmacia Brasileira**, p. 22, 2006.

HORCAJADA, P. et al. Metal–Organic Frameworks as Efficient Materials for Drug Delivery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 5974-5978, 2006.

HUXFORD, R. C.; ROCCA, J. D.; LIN W. Metal–organic frameworks as potential drug carriers. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 262-268, 2010.

IONASHIRO, M. **Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. Araraquara: GIZ Editora, 2004. 96 p.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. J. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23/24, p. 1173-1184, 2013.

KAEWNOPPARAT, N. et al. Increased Solubility, Dissolution and Physicochemical Studies of Curcumim – Polyvinylpyrrolidone K-30 Solid Dispersions. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 55, p. 229-234, 2009.

KANG, L. et al. Investigating metal-organic framework as a new pseudo-capacitive material for supercapacitors. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 957-961, 2014.

KARAGIARIDI, O. et al. Opening ZIF-8: A Catalytically Active Zeolitic Imidazolate Framework of Sodalite Topology with Unsubstituted Linkers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 18790-18796, 2012.

KESKIN, S.; KIZILEL, S. Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks. **Ind. Eng. Chem. Res.**, p. 1-14, 2010.

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

KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-13, 2014.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 48-49, 1975.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. Effect of compaction pressure on the compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution efficiency of some direct compression systems. **Pharmaceutical Acta Helvetiae**, v. 47, p. 594-607, 1972.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1984. 207 p.

KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KWON, H. T.; JEONG, H. Improving propylene/propane separation performance of Zeolitic-Imidazolate framework ZIF-8 Membranes. **Chemical Engineering Science**, p. 1-7, 2014.

LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 1. ed. Lisboa: Fundação Galoute Guldenkian, 2001. 1017 p.

LAMAS, M. C. et al. Development of parenteral formulation and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **Int. J. Pharm**, v. 307, n. 2, p. 239-243, 2006.

LEE, J. Y.; WU, H.; LI, J. An investigation of structural and hydrogen adsorption properties of microporous metal organic framework (MMOF) materials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 10473-10478, 2012.

LEI, J. et al. Design and sensing applications of metal–organic framework composites. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 58, p. 71-78, 2014.

LEITE, A. C. L. et al. Ruthenium complexes endowed with potent anti-Trypanosoma cruzi activity: Synthesis, biological characterization and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 5038-5043, 2009.

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

LIMA, A. A. N. **Desenvolvimento de dispersões sólidas e complexos de inclusão para benznidazol em formas farmacêuticas sólidas**. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

LIMA, A. A. N. et al. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2443–2451, 2011.

LIU, S. et al. Zeolitic imidazolate framework-8 as a luminescent material for the sensing of metal ions and small molecules. **Journal of Material Chemistry**, v. 21, p. 6649-6653, 2011.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LYRA, M. A. M. **Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

LYRA, M. A. M. et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 25, n. 5, p. 784-793, 2007.

MALTA, J. **Doença de Chagas**. São Paulo: Editora Sarvier, 1996.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MANARIN, R. et al. Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology International**, v. 62, p. 79-81, 2013.

MANTILLA, J. S.; SUÁREZ, E. U.; BARRAZA, M. F. Enfermedad de Chagas: correlación clínico-patológica. Serie de casos del Hospital Universitario de Santander. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 18, n. 5, p. 249-261, 2011.

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

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MATSUDA, H. et al. Determination and prediction of solubilities of active pharmaceutical ingredients in selected organic solvents. **Fluid Phase Equilibria**, v. 406, p. 116-123, 2015.

MELGAR, V. M. A. Highly selective micro-porous ZIF-8 membranes prepared by rapid electrospray deposition. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, p. 1-5, 2014.

MORAN, M. et al. Neglected Disease Research and Development: How much are we really spending ? **Plos Medic.**, v. 6, n. 2, 2009.

MOYANO, M. A.; BROUSSALIS, A. M.; SEGALL, A. I. Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipients. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 99, p. 631-663, 2010.

MURPHY, D. B.; SPRING, K. R.; DAVIDSON, M. W. Introduction to Polarizes Light. **Nikon Microscopy**. Disponível em: <<https://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedlightintro.html>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, F. P. **Influência no processamento na obtenção de biocerâmicas a base de hidroxiapatita**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2008.

OLIVEIRA, M. F. et al. Tratamento etiológico da doença de chagas no Brasil. **Patol. Trop.**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

ORDOÑEZ, M. J. C. et al. Molecular sieving realized with ZIF-8/Matrimid® mixed-matrix membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 361, n. 1-2, p. 28-37, 2010.

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

PAAKKUNAINEN, M. et al. Uncertainty in dissolution test of drug release. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 97, p. 82-90, 2009.

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

PAPPORELLO, R. L.; MIRÓ, E. E.; ZAMARO, J. M. Secondary growth of ZIF-8 films on to copper-based foils. Insight into surface interactions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 211, p. 64-72, 2015.

PARK, K. S. et al. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 27, p. 10186-10191, 2006.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, p. 169-172, 1989.

PEREIRA, J. G. et al. Termogravimetria: um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio em cascas de ovos. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1661-1666, 2009.

PESSANHA, A. F. V. et al. Influence of functional excipients on the performance of drugs in dosage forms, **Rev. Bras. Farm.**, v. 93, n. 2, p. 136-145, 2012.

PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A. A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, p. 1294–3000, 2008.

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**, v. 43, n. 4, p. 491–502, 2007.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **IL Farmaco**, v.58, p. 541-550, 2003.

PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. **IL Farmaco**, v. 54, p. 1-14, 1999.

QURESHI, S. A.; SHABNAM, J. Cause of high variability in drug dissolution testing and its impact on setting tolerances. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 271-76, 2001.

QURESHI, S. A.; SHABNAM, J. Applications of a new device (spindle) for improved characterization of drug release (dissolution) of pharmaceutical products. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, p. 291-297, 2003.

ROBINSON, P. C.; DAVIDSON, M. W. Introduction to Polarized Light Microscopy. **Nikon Microscopy**. Disponível em :<<https://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>>. Acesso em : 28 ago. 2015.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, I. R. **Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas a Base de Quitosana com PVP e PVA para aplicação na liberação controlada de fármacos**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

RODRIGUES, O. P. et al. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, n. 24, p. 383, 2005.

RODRÍGUEZ-GUARDADO, A. et al. Infección combinada por virus de la inmunodeficiencia humana y enfermedad de Chagas tratada satisfactoriamente con benznidazol y una pauta de tratamiento antirretroviral basada en raltegravir: descripción de un caso. **Med. Clin. (Barc.)**, v.137, n. 6, p. 278-280, 2011.

ROLIM, L. A. **Estudo da degradação do fármaco benznidazol utilizado no combate a doença de chagas por hidrólise, oxidação, fotólise e termodegradação**. 2012. 129 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

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

ROSA, T. C. C. **Dissolução intrínseca de hidroclorotiazida de diferentes granulometrias e sua relação com a dissolução do ativo em comprimidos**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

ROSAS, F. Enfermedad de Chagas. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 18, n. 5, p. 241-244, 2011.

ROSSEINSKY, M. J. Recent developments in metal–organic framework chemistry: design, discovery, permanent porosity and flexibility. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 73, p. 15-30, 2004.

ROUSELL, J. L. C.; YAGHI, O. M. Metal–organic frameworks: a new class of porous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 73, p. 3-14, 2004.

SAGGIA, M. G.; SANTOS, E.; DIETZE, R. Custo-efetividade de benzonidazol para a doença de chagas no Brasil. In: **VIII ENCONTRO ABRES**, 2007, Recife. Disponível em: <<http://www.abresbrasil.org.br/pdf/13.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2011.

SANTOS, F. L. A. **Desenvolvimento de comprimido de liberação prolongada de benznidazol**. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SANTOS, F. L. A. et al. A study of photostability and compatibility of the anti-chagas drug Benznidazole with pharmaceuticals excipients. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 1, p. 63-69, 2015.

SATHIGARI, S. et al. Amorphous-State Characterization of Efavirenz-Polymer Hot-Melt Extrusion Systems for Dissolution Enhancement. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3456-3464, 2012.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropical**, v. 115, p. 14-21, 2010.

SCLIAR, M. **Oswaldo Cruz e Carlos Chagas – o nascimento da ciência no Brasil**. São Paulo: Odysseus Editora, 2002.

SHAH, S. et al. Melt extrusion with poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 233-252, 2013.

SHAHID, S. **Polymer-Metal Organic Frameworks (MOFs) Mixed Matrix Membranes for Gas Separation Applications**. 2015. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Membranas, Universidade de Twente, Enschede, 2015.

SIKORA, B. J. et al. Textural properties of a large collection of computationally constructed MOFs and zeolites. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 186, p. 207-213, 2014.

SILVA, A. L. M. D. et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para a doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163-1166, 2007.

SINGH, B.; KAUR, T.; SINGH, S. Correction of raw dissolution data for loss of drug and volume during sampling. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 4, p. 196-199, 1997.

SOARES-SOBRINHO, J. L. **Sistemas de vetorização do benznidazol para o tratamento da doença de chagas**. 2009. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Desenvolvimento e validação do método analítico para o doseamento de benznidazol. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 3, p. 78-80, 2006.

STEINGRÄBER, T.; SHTOLTZ, T.; RODRIGUES, P. O. Avaliação da influência de adjuvantes não-poliméricos solúveis na liberação do nimodipino a partir de formulações matriciais de liberação prolongada. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, v. 37, n. 2, p. 122-132, 2008.

STORPIRTIS, S. et al. **Ciências Farmacêuticas - Biofarmacotécnica**. Estado: Guanabara Koogan, 2011. 321 p.

SUN, D. D.; JU, T. R.; LEE, P. I. Enhanced kinetic solubility profiles of indomethacin amorphous solid dispersions in poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, p. 149-158, 2012.

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

SUN, C. et al. Zeolitic imidazolate framework-8 as efficient pH-sensitive drug delivery vehicle. **Dalton Trans.**, v. 41, p. 6906-6909, 2012.

SYKULA-ZAJA, A. et al. Thermal and X-ray analyses of racemic bupivacaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v. 105, p. 1031-1036, 2011.

TAO, Y. et al. Mesopore-modified zeolites: preparation, characterization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 896-910, 2006.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

TROCHINE, A. et al. Trypanosoma cruzi chemical proteomics using immobilized benzimidazole. **Experimental Parasitology**, v. 140, p. 33-38, 2014.

VIEIRA, A. C. Q. M. et al. J. Physical-chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 115, p. 2339-2349, 2013.

WANG, Z.; SHMEIS, R. A. Dissolution Controlled Drug Delivery Systems. Design of controlled Release Drug Delivery Systems. **Chemical Engineering**, p. 139-172, 2006.

WEAVER, R. Rediscovering Polarized Light Microscopy. **American Laboratory**, p. 55-61, 2003.

WEBB, P.A.; ORR, C. **Analytical Methods in Fine Particle Technology**. USA: Micromeritics, 1997. 301 p.

WEBER, C. **Influência do processamento via emulsão em compósitos de hidroxiapatita-zircônia**. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2008.

YAGHI, O M. ; O'KEEFFE, M. ; KANATZIDIS, M. Design of solids from molecular building blocks: golden opportunities for solid state chemistry. **Journal of solid state chemistry**, v. 152, p.1-2, 2000.

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

YAO, J. et al. Formation of ZIF-8 membranes and crystals in a diluted aqueous solution. **Materials Chemistry and Physics**, v. 139, p. 1003-1008, 2013.

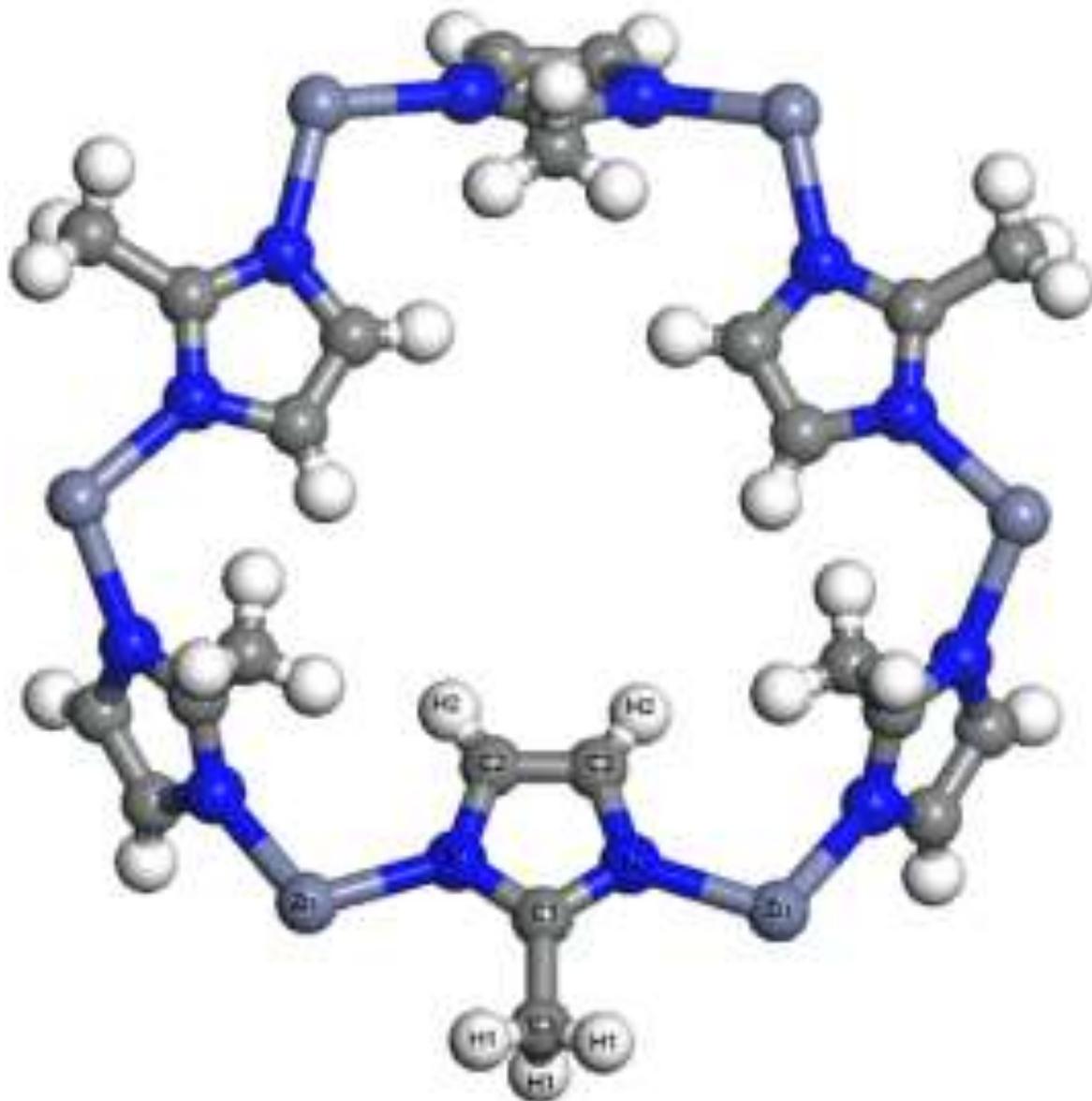
YIN, H. et al. Thermal stability of ZIF-8 under oxidative and inert environments: A practical perspective on using ZIF-8 as a catalyst support. **Chemical Engineering Journal**, p. 1-8, 2014.

ZHANG, C. et al. High performance ZIF-8/6FDA-DAM mixed matrix membrane for propylene/propane separations. **Journal of Membrane Science**, v. 389, p. 34-42, 2012.

ZHANG, Y. et al. DDSolver : an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263-271, 2010.

ZHENHAO, D. et al. Design and Development of Pharmaceutical Excipients Database. **Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica**, v. 13, n. 4, p. 611-615, 2011.

ZHUANG, J. et al. Optimized metal-organic framework nanospheres for drug delivery: evaluation of small-molecule encapsulation. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 2812-2819, 2014.

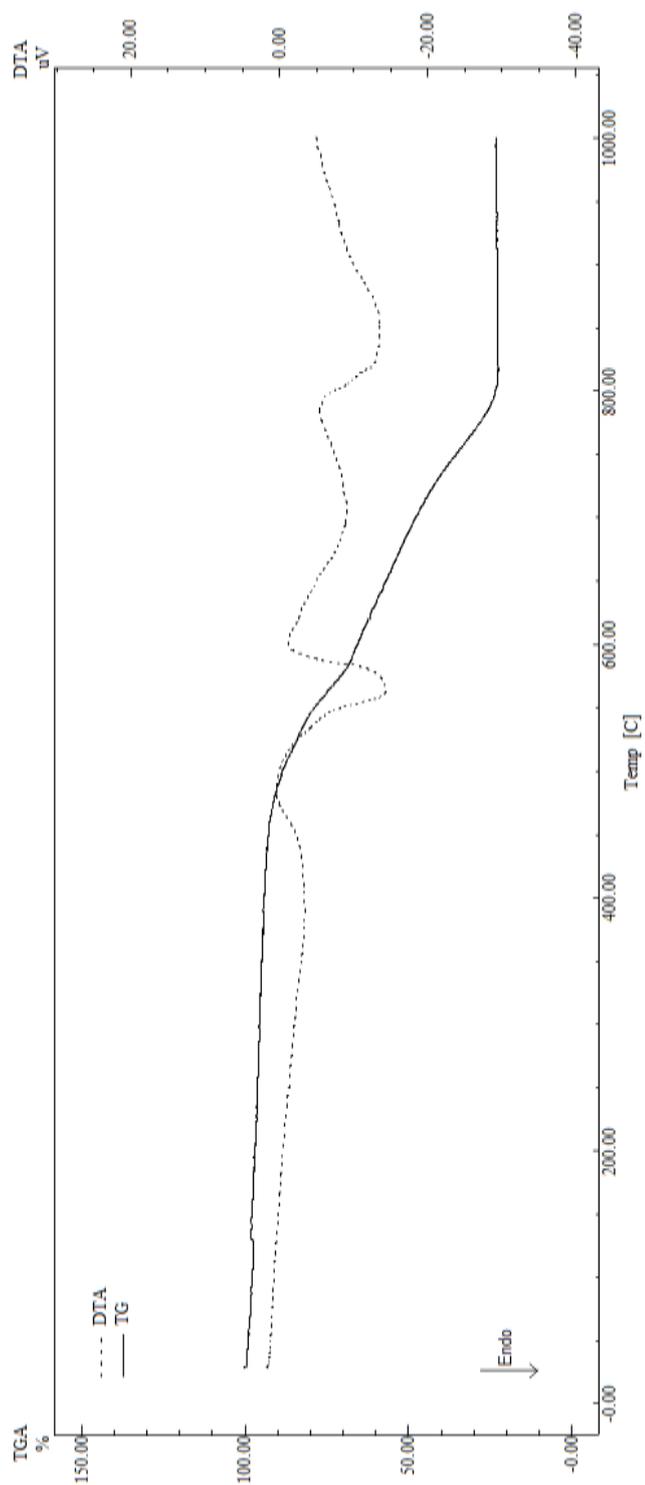


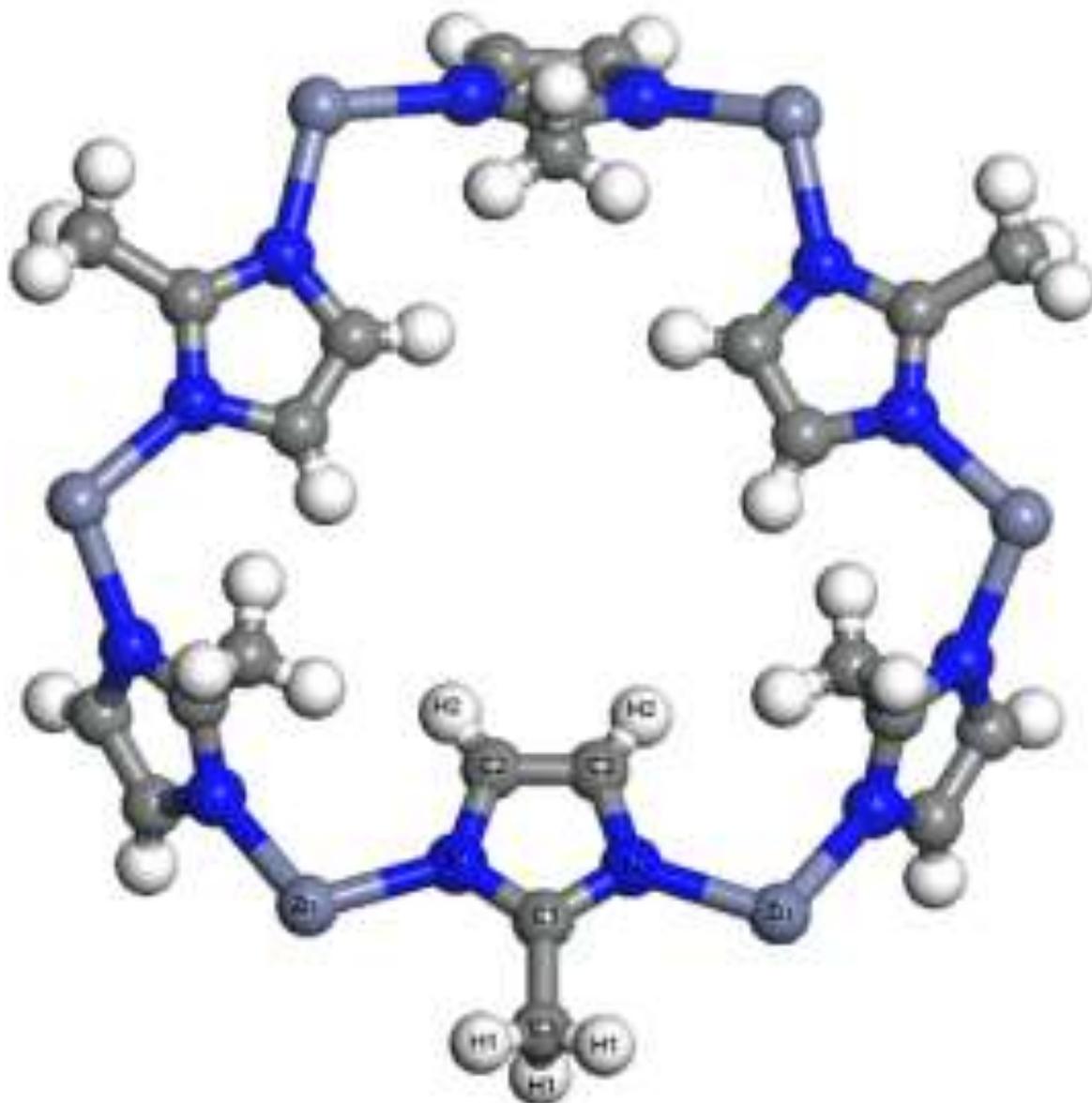
APÊNDICE

APÊNDICE

APÊNDICE A – Curva TG/DTA da ZIF-8

APÊNDICE A – Curva TG/DTA da ZIF-8





ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A -Certificado de análise do controle de qualidade do Benznidazol

ANEXO B – Depósito do pedido da patente intitulada “Formulações farmacêuticas contendo associações de benznidazol e MOF’s para obtenção tecnológica de sistemas *Drug Delivery*”

ANEXO A - Certificado de análise do controle de qualidade do Benznidazol

CERTIFICADO DE ANÁLISE		Controle de Qualidade		Código: 302400001	
BENZNIDAZOL		Lote nº: 301045		Rev.: 00	Pág 1 / 1
		Data de Fabricação: JANEIRO/2014		Referência: Hoffmann La Roche	
				Data de Validade: JANEIRO/2016	

TESTES	RESULTADOS	ESPECIFICAÇÕES
. Aparência	. De acordo	. Pó fino
. Cor	. Levemente amarelado	. Branco, amarelo esbranquiçado ou levemente amarelo.
. Identificação Infravermelho	. De acordo	. De acordo com o padrão.
. Opalescência da solução a 1% (p/v) em acetona.	. Límpido – 1,0 NTU	. Límpida (Máximo 3,0 NTU)
. Cor da solução a 1% (p/v) em acetona	. <BY6	. Máximo (EP): GY ₆ , BY ₆ ou B ₆ .
. pH da solução 1% (p/v) suspensão em água	. 5,1	. 5,0 – 7,0
. Absorbância no UV em metanol λ máximo A (1%, 1 cm) λ mínimo	. 315 nm . 286,2 . 265 nm	. 313 – 317 nm . 286 – 304 . 262 – 266 nm
. Ponto de fusão	. 192 °C	. 189 °C – 192 °C
. Perda por secagem	. 0,1%	. Máximo 0,5%
. Cinzas sulfatadas	. 0,0%	. Máximo 0,1%
. Metais pesados	. <20 ppm	. Máximo 20 ppm
. Substâncias relacionadas 2-nitroimidazol N-benzil-2-cloroacetamida Impureza desconhecida Total de imp. Desconhecida Soma total de impurezas	. <0,1% . <0,1% . <2 . <0,1% . <0,1%	. Máximo 0,1% . Máximo 0,1% . Máximo 2 impurezas . Máximo 0,1 % . Máximo 0,3%
. Teor (base seca)	. 100,8%	. 98,5 – 101,5%
. Granulometria Através da peneira nº120 USP Partículas estranhas	. 93% . Ausente	. Mínimo 85% . Ausente

Embalagem: Manter o recipiente hermeticamente fechado e evitar temperatura superior a 30°C.

Aprovado pelo Gerente do Controle de Qualidade conforme especificação acima e reconciliação de todos os documentos do lote na data 18/01/2014 sob n° de análise 01/13-0125
Rua Dezessete, n° 200 – Distrito Industrial de Duque de Caxias – Xerém – D. Caxias-RJ
Cep: 25250-612 Tel.: + 55 21 3651-7300

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

