



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



TESE DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE *DRUG DELIVERY SYSTEM* pH-DEPENDENTE À BASE DE BENZNIDAZOL E ZIF-8 VISANDO A OBTENÇÃO DE UMA TERAPIA ALTERNATIVA PARA A DOENÇA DE CHAGAS

LESLIE RAPHAEL DE MOURA FERRAZ

Recife

2017

LESLIE RAPHAEL DE MOURA FERRAZ

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO IN VITRO DE DRUG
DELIVERY SYSTEM pH-DEPENDENTE À BASE DE BENZNIDAZOL E ZIF-8
VISANDO A OBTENÇÃO DE UMA TERAPIA ALTERNATIVA PARA A DOENÇA
DE CHAGAS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Araújo Rolim

Recife

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F381d Ferraz, Leslie Raphael de Moura.
Desenvolvimento e avaliação da liberação *in vitro* de *drug delivery system* pH-dependente à base de benznidazol e ZIF-8 visando a obtenção de uma terapia alternativa para a doença de Chagas / Leslie Raphael de Moura Ferraz. – 2017.
4 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Tripanossomíase. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Sistemas de liberação de medicamentos. 4. MOF. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-014)

LESLIE RAPHAEL DE MOURA FERRAZ

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE *DRUG DELIVERY SYSTEM* pH-DEPENDENTE À BASE DE BENZNIDAZOL E ZIF-8
VISANDO A OBTENÇÃO DE UMA TERAPIA ALTERNATIVA PARA A DOENÇA
DE CHAGAS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 25/01/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite
(Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dr.^a. Keyla Emanuelle Ramos da
Silva (Examinador Externo)

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Severino Alves Junior
(Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dr.^a. Salvana Priscylla Manso Costa
(Examinador Externo)

Centro Universitário Maurício de Nassau

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

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer por esta onda de boas vibrações que vem me cercando. Nessa energia eu vejo amor, e neste amor eu vejo Deus. Muito obrigado!

Ao meu orientador **Pedro Rolim**, pela amizade e confiança. Por ter me aceitado do jeito que sou e por ter me formado uma pessoa melhor, mais respeitosa e mais correta. Meu exemplo de líder, de conduta e de profissionalismo. Obrigado por sempre me dizer as coisas que eu preciso ouvir. “*Oh Captain! My Captain*”!

À família LTM, por me proporcionar um local de trabalho agradável, cheio de harmonia e de boas energias. Feliz é aquele que tem a oportunidade de se sentir em casa, mesmo tendo acabado de chegar no seu local de trabalho. Obrigado a todos pelas conversas técnico-científicas (ou não), e por toda a felicidade que partilhamos ao longo de todos esses anos. Gostaria de fazer um agradecimento especial aos membros do grupo MOF: **Alinne Alves, Débora Dolores, Isabela Amariz, Aline Ferreira, Rodrigo Oliveria**; vocês foram a força-motriz deste projeto.

À minha mentora e co-orientadora **Larissa Rolim**, por ser uma amiga fiel, por torcer por mim e por ter percebido que eu precisava de ajuda. Você me ajudou a superar uma fase muito ruim e me mostrou que é possível ser cada vez melhor naquilo que se ama fazer. Seu amor pela docência foi incorporado ao meu. Obrigado por servir de combustível para os meus sonhos.

Ao **Prof. Severino Alves Junior** e seus alunos do Laboratório de Terras Raras, do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, pela doação da ZIF-8 e por ser um colaborador presente e atencioso. À Prof^ª. **Keyla Ramos** da Universidade Federal do Amazonas, pela amizade e por servir de exemplo de conquista Minha conterrânea, você me fez acreditar que o nosso sonho é do tamanho da nossa vontade de continuar lutando: infinito. À Prof^ª. **Rosali Ferreira**, pela disponibilidade e atenção no tocante da publicação dos resultados e da proteção da propriedade intelectual.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, prezadas **Nerilin Trajano e Júlia Hellen**, pelas risadas e pela paciência. Ao **Departamento de Física, Departamento de Química** e ao **CETENE** e seus respectivos técnicos pela disponibilização dos equipamentos para realização das mais diversas análises de caracterização. Em especial ao **Laboratório de Gemologia do Departamento de Geologia/UFPE**, principalmente a Prof^ª.

Dra^a. **Sandra Brito** pela realização das análises de Microscopia de Luz Polarizada. A **Jorge Pereira** do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pela parceria na realização dos estudos de viabilidade celular.

À **Salvana Costa**, por ser minha irmã de outra vida. Obrigado por estar ao meu lado e por me emprestar sua família naquele momento onde eu não sabia mais o real significado da palavra *família*. Obrigado por ter vivido comigo alguns dos momentos mais divertidos da minha vida até então. Teremos mais, com certeza.

Às minhas parceiras de república **Cybelly Marques** e **Larissa Morgana** pelas boas conversas e por me proporcionarem um ambiente saudável e amigável, um lar.

A **Arthur Perrier** por ser meu parceiro incentivador e motivador. Por querer me ver bem a todo momento e por partilhar nossos medos e anseios. Obrigado pela cumplicidade. Dedico parte desta conquista a você.

À **Lilian Raffaele**, minha irmã, a única que eu sei que posso contar de verdade. Que nunca me virou as costas e que é a minha maior fã. Dedico a você também esta vitória. E aos meus pais que me educaram e me deram os subsídios necessários para chegar até aqui. Espero ter conseguido satisfazer as suas expectativas.

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

RESUMO

O parasita *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, que figura como um dos graves problemas de saúde pública de países em desenvolvimento. Único fármaco disponível para a terapêutica da doença de Chagas, o benznidazol (BNZ) é um derivado 2-nitroimidazol com largo espectro de atividade farmacológica antiparasitária. Entretanto, o BNZ apresenta entraves biofarmacotécnicos: grandes doses administradas, tratamentos prolongados, a alta incidência de reações adversas; tudo devido a sua baixa solubilidade aquosa, uma vez que pertence à classificação biofarmacêutica de classe II. O papel da tecnologia farmacêutica é, então, prover alternativas capazes de incrementar a solubilidade do BNZ e modular sua liberação a fim de obter um tratamento alternativo de maior qualidade e com maior aceitação pelo paciente. Neste contexto, o presente trabalho objetivou desenvolver *Drug Delivery Systems* (DDS) à base de BNZ e do excipiente inovador *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF-8), a fim de utilizá-lo nos estudos de pré-formulação de forma farmacêutica de liberação prolongada para o tratamento alternativo da doença de Chagas. Os sistemas foram obtidos em diferentes proporções molares após otimização de um método *ex situ* de incorporação do fármaco. A maior eficiência de incorporação foi o critério escolhido para a seleção do melhor DDS. Em seguida, foram realizadas diferentes caracterizações físico-químicas visando avaliar a formação do sistema e a cinética de liberação *in vitro* do fármaco através de ensaios de dissolução e diálise sob condições *sink* e *non-sink*. Para fins comparativos, foram utilizadas misturas físicas na proporção molar de 1:1. Os dados de liberação foram analisados através da área sob a curva (AUC) e ajuste dos resultados quanto aos métodos modelo-dependente e -independente. O sistema BNZ:ZIF-8 1:1 (mol:mol) obtido em acetona foi o selecionado por apresentar maior eficiência de incorporação (em média 38%) após 4 dias de agitação intermitente. As diferentes técnicas de caracterização utilizadas corroboraram a formação do sistema. Os estudos de liberação *in vitro* do BNZ através de dissolução e de diálise mostraram que houve modulação da liberação do fármaco de acordo com o pH utilizado em condições *sink* e *non-sink*. A modulação da liberação foi corroborada tanto pelo ajuste dos resultados a diferentes modelos cinéticos e alteração do mecanismo de liberação do fármaco, quanto pela diferença entre os perfis de liberação comprovada pelo fator de semelhança. Assim, em pH 4,5 o sistema apresentou uma liberação mais rápida, com efeito *burst*, enquanto que em pH 7,6 houve uma liberação prolongada, mais lenta e sem efeito *burst*. Em vista dos argumentos apresentados, fica evidente que foi obtido um DDS pH-dependente promissor a ser utilizado como inovador carreador do BNZ em formas farmacêuticas destinadas ao tratamento alternativo da doença de Chagas.

Palavras-chave: Tripanossomíase. *Trypanosoma cruzi*. Sistemas de Liberação de Medicamentos. MOF.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas' disease and consist in one of the major public health problems in developing countries. Only drug available for the treatment of Chagas' disease, benznidazole (BNZ) is a 2-nitroimidazole derivative with broad-spectrum antiparasitic activity. However, BNZ has biopharmaceutical barriers: large doses, prolonged treatments, the high incidence of adverse reactions; all due to its low aqueous solubility, since it belongs to the biopharmaceutical classification II. Therefore, pharmaceutical technology provides alternatives capable of increasing the solubility of the BNZ and modulate its release in order to obtain an alternative treatment with higher quality and greater patient acceptance. In this context, this study aimed to develop a Drug Delivery Systems (DDS) based on BNZ and the innovative excipient Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF-8) aiming to use it in the pre-formulation studies of extended release dosage forms to alternative treatment of Chagas' disease. The systems were obtained at different molar ratios after optimization of an *ex situ* method of drug incorporation. The largest uptake efficiency was the criterion used for selecting the best DDS. Then, different characterizations were performed to evaluate the system obtainment, including the kinetics of drug *in vitro* release through dissolution tests and dialysis under *sink* and *non-sink* conditions. For comparison, physical mixtures (PM) were used in the molar ratio 1:1. The release data were analyzed by the area under the curve (AUC) and setting the kinetic results through methods model dependent and independent. The BNZ:ZIF-8 1:1 (mol:mol) system was selected because of its higher incorporation efficiency (38%) after 4 days of intermittent agitation. The different characterization techniques corroborated the obtainment of the system. *In vitro* release studies of BNZ through dissolution and dialysis showed that there was modulation of the drug release according to the pH used in *sink* and *non-sink* conditions. Modulation of the release was corroborated by the adjustment of the results to different kinetic models and alteration of the mechanism of drug release, as well as by the difference between the release profiles evidenced by the similarity factor. Thus, at pH 4.5 the system showed a faster release with burst effect, while at pH 7.6 there was a prolonged, slower release with a reduce in the burst effect. Finally, it is evident that a promising DDS pH-sensitive was obtained to be used as the novel carrier of BNZ in dosage forms intended for the alternative treatment of Chagas' disease.

Keywords: Trypanosomiasis. *Trypanosoma cruzi*. Drug Delivery System. MOF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
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	29
Figura 3 – Fórmula estrutural (tridimensional) do benznidazol	33
Figura 4 – Representação esquemática que mostra a construção da MOF, demonstrando a parte inorgânica, a parte orgânica e uma das topologias da MOF como produto..	45
Figura 5 – Três exemplos de redes zeólitas: a) Contendo um sistema de canais bidimensionais; b) Contendo cavidades; c) Contendo um sistema de canais unidimensionais.	52
Figura 6 – Classificação das ZIF's quanto ao seu modelo de coordenação. A) Unidimensional. B) Bidimensional e C) Tridimensional.	53
Figura 7 – Representações tridimensionais da ZIF-8. a) Único poro com conformação em sodalita (esferas: átomo de zinco; traços: grupos 1,4-Benzenodicarboxilato); b) Rede de coordenação representando sodalita central circundada por outras oito; c) Representação tridimensional da ZIF-8	54
Figura 8 – Encapsulamento de pequenas moléculas à rede da ZIF-8 evidenciando o zinco tetraédrico, o 2-metilimidazolato e uma pequena molécula de fármaco a ser complexada.	55
Figura 9 – Ilustração esquemática mostrando a liberação do 5-fluoracil em pH 5,0 (topo), devido dissociação da ZIF-8, e em pH 7,4 (abaixo). C = cinza, N = blue, O = vermelho, F = azul claro, Zn = verde.	56
Figura 10 – Modelo de agitador de dissolutor no modelo de pás (aparato 2).....	82
Figura 11 – Fluxograma geral para obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8	89
Figura 12 – Aspecto macroscópico dos materiais: BNZ, MF e sistemas obtidos em água e acetona.	99
Figura 13 – Varredura do espectro de absorção na região do UV-Vis do BNZ e da ZIF-8	100
Figura 14 – Curvas de incorporação do BNZ à rede da ZIF-8 em água (preto, linha contínua) e em acetona (vermelho, linha tracejada).	101
Figura 15 – Curvas de incorporação e valor de eficiência de incorporação (EI%) dos sistemas BNZ:ZIF-8 nas proporções molares 1:3; 3:1 e 6:1 mol/mol.....	103
Figura 16 – Espectros de infravermelho do BNZ, da ZIF-8, da MF e do sistema BNZ:ZIF-8 (1:1) obtido em acetona (os espectrogramas estão na mesma escala).	105
Figura 17 – Curvas TG do BNZ, da ZIF, da MF e dos sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1) obtidos em solução aquosa e em acetona ($\beta=10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).	108

Figura 18 – Curvas DSC do BNZ, da ZIF, da MF e dos sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1) obtidos em solução aquosa e em acetona ($\beta=10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (as linhas mais claras correspondem ao evento de fusão e de degradação térmica do fármaco isolado).....	111
Figura 19 – DRX do BNZ, da ZIF-8, MF e dos sistemas obtidos em água e em acetona.	113
Figura 20 – Microscopia Eletrônica de Varredura do a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF BNZ:ZIF-8 (1:1 mol/mol); g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 mol/mol) obtido em meio aquoso; i) e j) BNZ@ZIF-8.....	116
Figura 21 – Microscopia de Luz Polarizada do a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF; g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 mol/mol) obtido em meio aquoso; BNZ@ZIF-8.....	118
Figura 22 – a) Gráfico de tamanho de partícula por granulometria à laser do BNZ e b) da ZIF-8.....	119
Figura 23 – Perfil de dissolução nas condições sink do BNZ, MF e do sistema BNZ@ZIF-8 em pH 4,5.....	122
Figura 24 – Perfil de dissolução na condição sink do BNZ, MF e do sistema BNZ@ZIF-8 em pH 7,6.....	123
Figura 25 – Perfil de dissolução comparativo na condição sink do sistema BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.....	124
Figura 26 – Perfil de dissolução nas condições non-sink do BNZ, MF e sistema BNZ@ZIF-8 em pH 4,5.....	130
Figura 27 – Perfil de dissolução nas condições non-sink do BNZ, MF e sistema BNZ@ZIF-8 em pH 7,6.....	131
Figura 28 – Perfil de dissolução comparativo na condição non-sink do sistema BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.....	132
Figura 29 – Ensaio de liberação in vitro a partir de membrana de diálise (1 kDa) nas condições sink em pH 4,5 do BNZ e do sistema BNZ@ZIF-8.....	138
Figura 30 – Ensaio de liberação in vitro a partir de membrana de diálise (1 kDa) nas condições sink em pH 7,6 do BNZ e do sistema BNZ@ZIF-8.....	139
Figura 31 – Perfil comparativo da diálise na condição non-sink do sistema BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.....	140
Figura 32 – Efeitos do BNZ, ZIF-8 e BNZ@ZIF-8 em diferentes concentrações na viabilidade de células humanas (PBMC) de acordo com o ensaio MTT em tempo de exposição: A) 24 horas e B) 48 horas.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelização dos mecanismos de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos de liberação controlada considerando as diferentes geometrias.	68
Tabela 2 – Modelos matemáticos de estudo cinético usados na avaliação do perfil de dissolução.....	94
Tabela 3 – Concentração inicial e concentração analisada no momento da coleta (dia 4) e respectivos desvios-padrão.	102
Tabela 4 – Resultados comparativos do perfil térmico obtido através das curvas TG dos materiais: BNZ, ZIF-8, mistura física e sistema.....	107
Tabela 5 – Resultados comparativos do perfil térmico obtido através das curvas DSC dos materiais: BNZ, ZIF-8, mistura física e sistema.....	110
Tabela 6 – Cálculo do espaçamento basal dos picos de reflexão 110, 002 e 112 da ZIF-8, Mistura Física e Sistemas obtidos em água e em acetona.	114
Tabela 7 – Resultados da análise granulométrica e da área superficial, tamanho e volume de poros do BNZ e da ZIF-8.....	120
Tabela 8 – Média e desvio padrão da concentração de BNZ solúvel em água.....	121
Tabela 9 – Valores médios de AUC do BNZ, da MF e do sistema BNZ@ZIF-8 nas condições sink e em pH 4,5.	125
Tabela 10 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e sistema BNZ@ZIF-8 em pH 7,6 sob condições sink.....	126
Tabela 11 – Coeficientes de determinação (R^2) e $R^2_{ajustado}$ obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando o BNZ e sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's (4,5 e 7,6) nas condições sink do ensaio de dissolução in vitro.	127
Tabela 12 – Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's nas condições sink.....	128
Tabela 13 – Valores dos fatores de semelhança f_2 comparando os perfis de dissolução in vitro nas condições sink BNZ-MF e BNZ-BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.....	129
Tabela 14 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e BNZ@ZIF-8 em pH 4,5 sob condições non-sink.....	133
Tabela 15 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e BNZ@ZIF-8 em pH 7,6 sob condições non-sink.....	134
Tabela 16 – Coeficientes de determinação (R^2) e $R^2_{ajustado}$ obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando o BNZ e sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's (4,5 e 7,6) nas condições non-sink do ensaio de dissolução in vitro.	135

Tabela 17 – Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's nas condições non-sink.
..... 136

Tabela 18 – Valores dos fatores de semelhança f_2 comparando BNZ-MF e BNZ-BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6. 137

Tabela 19 – Valores (em porcentagem) da viabilidade celular obtida pelo método MTT.142

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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
DDS	<i>Drug Delivery System</i>
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês deoxyribonucleic acid)
DRX	Difração 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 Orgânico-Metálica (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+
TCI–Tc TVI	Linhagem do <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TG	Termogravimetria
TGI	Trato Gastrointestinal
USP	Farmacopeia Americana (do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
ZIF-8	do inglês <i>Zeolitic Imidazolate Framework</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mg.Kg ⁻¹	Miligrama por quilograma
mg	Miligrama
®	Marca Registrada
Cr	Cromo
Fe	Ferro
g	Gramas
<i>d</i>	Diâmetro
d<	Diâmetro menor que
Å	Angstrom
d≤	Diâmetro menor ou igual que
>	Maior que
Si	Silício
Al	Alumínio
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetro
g.L ⁻¹	Gramas por litro
g.(cm ³) ⁻¹	Gramas por centímetros cúbicos
m ² .g ⁻¹	Metros quadrados por grama
µm	Micrômetro
Zn	Zinco
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
mm	Milímetro
±	Mais ou menos
mL.min ⁻¹	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^{-1}	Gramas por mol
g.mL^{-1}	Gramas 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_{∞} completa	Quantidade de fármaco dissolvido quando a forma farmacêutica se desintegra completa
K	Constante
ml.min^{-1}	Mililitro por minuto
$^{\circ}\text{C.min}^{-1}$	Graus Celsius por minuto
d	Espaçamento basal
sem θ	Seno do ângulo Theta
n	Coefficiente de liberação

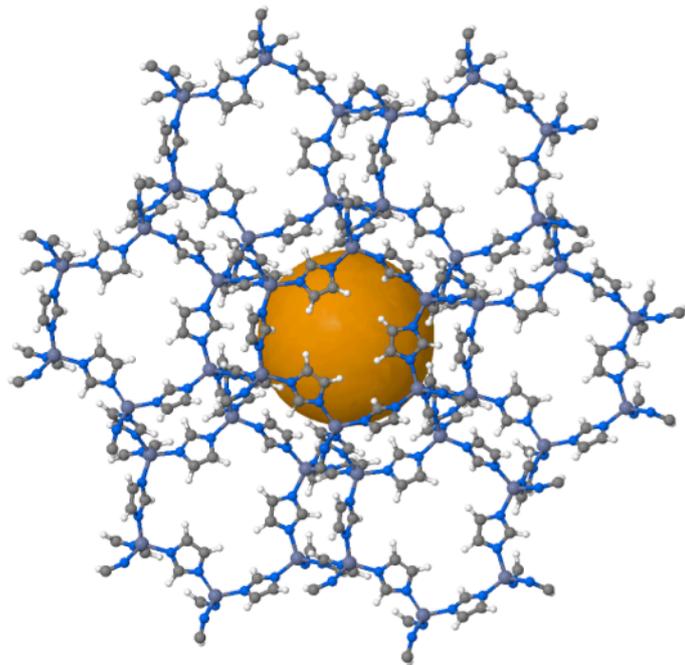
°	Graus
mL.h ⁻¹	Mililitro por hora
K	Kelvin
µg.mL ⁻¹	Micrograma por mililitro
ΔH	Variação de entalpia
mJ	Milijoule
J	Joule
p/p	Relação concentração peso – peso
mol/mol	Mol por mol
m ² .mL ⁻¹	Metros quadrados por mililitro
cm ³ .g ⁻¹	Centímetros cúbicos por grama
min.µL.mL ⁻¹	Minuto por microlitro por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	23
2.1.1 Agente etiológico: morfologia e ciclo evolutivo	25
2.1.2 Abordagem clínica do paciente chagásico	27
2.1.3 A terapêutica da doença de Chagas: Benznidazol e o tratamento específico	32
2.2 TECNOLOGIA FARMACÊUTICA: INOVAÇÃO APLICADA AO BENZNIDAZOL	39
2.3 METAL ORGANIC FRAMEWORKS E SUAS APLICAÇÕES COMO EXCIPIENTES INOVADORES	43
2.3.1 Zeolitic Imidazolate Frameworks	51
2.4 LIBERAÇÃO CONTROLADA	61
2.4.1 Mecanismo de liberação de fármacos	65
2.5 CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS FARMACÊUTICOS	68
2.5.1 Difração de Raios-X (DRX)	69
2.5.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	70
2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
2.5.4 Método BET (Brunauer-Emmet-Teller) e Tamanho de Poro	72
2.5.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	74
2.5.6 Termogravimetria (TG)	75
2.5.7 Espectroscopia de absorção na região do UV-Visível (UV-Vis)	76
2.5.8 Microscopia de luz polarizada	77
2.5.9 Estudo de dissolução in vitro	78
2.5.10 Avaliação da viabilidade celular através do método MTT	83
3 OBJETIVOS	86
3.1 OBJETIVO GERAL	86
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	86
4 MATERIAL E MÉTODOS	88
4.1 MATERIAL	88
4.2 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS BNZ:ZIF-8	88

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	90
4.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis).....	90
4.3.2 Difração de Raios-X (DRX)	90
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	90
4.3.4 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	91
4.3.5 Análise térmica	91
4.3.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	92
4.3.7 Tamanho de partícula por granulometria à laser e análise de área superficial e de tamanho e volume de poros	92
4.3.8 Ensaio quantitativo de solubilidade.....	92
4.3.9 Ensaio de dissolução in vitro nas condições sink.....	93
4.3.10 Ensaio de dissolução in vitro nas condições non-sink.....	95
4.3.11 Ensaio de liberação in vitro – Diálise sob condições sink	96
4.3.12 Avaliação da viabilidade celular e da citotoxicidade in vitro atrav'rs do método MTT	96
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE OBTENÇÃO DOS SISTEMAS BNZ:ZIF-8	99
5.1.1 Aspecto Macroscópico	99
5.1.2 Avaliação da incorporação do fármaco nos sistemas BNZ:ZIF-8	100
5.1.3 Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	103
5.1.4 Análise Térmica (DSC, TG/DTG).....	105
5.1.5 Difração de Raios-X (DRX)	111
5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	114
5.1.7 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	117
5.1.8 Tamanho de Partícula por Granulometria à Laser e Análise de Área Superficial e Tamanho e Volume de Poros	119
5.1.9 Ensaio quantitativo de solubilidade.....	120
5.2 TESTES DE LIBERAÇÃO IN VITRO	121
5.2.1 Ensaio de dissolução in vitro nas condições sink.....	121
5.2.2 Ensaio de dissolução in vitro sob condições non-sink.....	129
5.2.3 Liberação in vitro por diálise	137

5.3 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO MTT	141
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
REFERÊNCIAS	147
APÊNDICES	168
ANEXOS	172



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada endêmica da América Latina, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Atingindo cerca de oito milhões de indivíduos, constitui um dos grandes problemas de saúde pública para as nações em desenvolvimento. Entretanto, países não-endêmicos, tais como: Estados Unidos da América, Canadá e Japão também têm registrado novos casos devido ao movimento migratório da população infectada. A prevalência e incidência destes casos revelam o impasse da manutenção da doença, que não possui diagnóstico ou tratamento adequados (COURA; VIÑAS, 2010; COURA, 2015)

O benznidazol (BNZ) é um derivado de 2-nitroimidazol com largo espectro de atividade farmacológica antiprotozoária e antiparasitária. É o único fármaco disponível para tratamento da doença de Chagas em países como o Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. Embora seja o único, o BNZ não é tido como o fármaco ideal, 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, prevenindo a progressão da doença. A terapêutica específica da doença de Chagas reduz a quantidade de recursos médicos utilizados pelo paciente durante a vida e economiza recursos do sistema de saúde, quando comparado com a não utilização do BNZ (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006; DONNICI et al., 2009; SANTO, 2009; SANTOS et al., 2012; VILLELA, 2009).

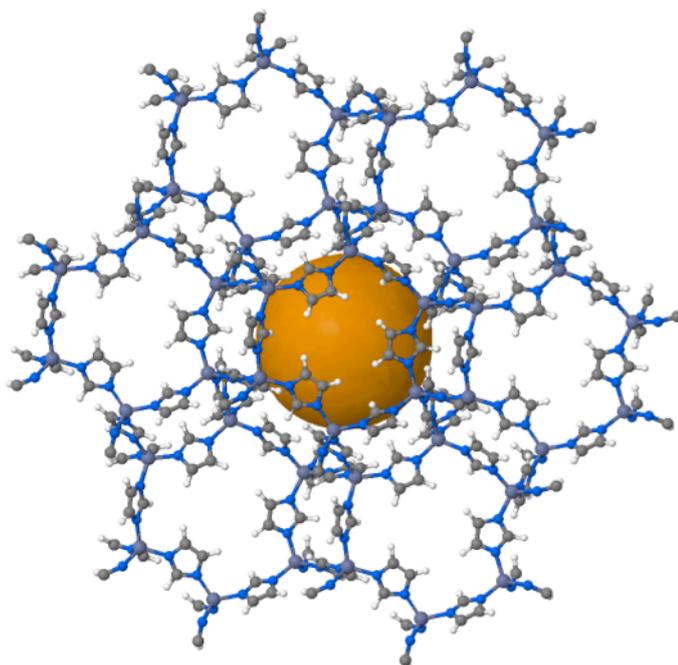
Devido às dificuldades de solubilização em meio aquoso, o BNZ possui baixa absorção no trato gastrointestinal e, conseqüentemente, pode apresentar reduzida biodisponibilidade. Desta forma, é papel da tecnologia farmacêutica obter novas alternativas para a terapia anti-Chagas. Neste contexto, os excipientes farmacêuticos possibilitam, entre outras funções, aumentar a estabilidade físico-química e microbiológica 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 (HAMMAN; STEENEKAMP, 2012; LIMA et al., 2011)

É neste contexto do incremento da solubilidade e da modulação da liberação de fármacos através de excipientes inteligentes que diversos sistemas carreadores de fármacos vêm sendo

desenvolvidos. Os também chamados *Drug Delivery System* (DDS) são constituídos dos mais diversos materiais: ciclodextrinas, dispersões sólidas, lipossomas (ANWEKAR; PATEL; SINGHAI, 2011; GOMES et al., 2015; LIMA et al., 2011; SOARES-SOBRINHO et al., 2012). Entre os mais recentes DDS, destacam-se as redes organometálicas de coordenação, do inglês *Metal Organic Framework* (MOF). As MOF's são materiais híbridos, orgânico-inorgânicos, que apresentam propriedades promissoras para serem utilizados como carreadores de fármacos, tais como: boas biodisponibilidade e biocompatibilidade, grande área de superfície, alta estabilidade térmica, alta capacidade de inserção de espécies iônicas e pequenas moléculas e promoção de uma liberação controlada das substâncias (AGUILERA-SIGALAT; BRADSHAW, 2016; HUXFORD; DELLA ROCCA; LIN, 2010; LIÉDANA et al., 2012; ZORNOZA et al., 2013).

Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF) é uma subclasse de MOF constituída por metais de coordenação tetraédricos, geralmente zinco ou cobalto, interconectados através de ligantes orgânicos (*linkers*) imidazois ou imidazolatos. Embora sejam semelhantes aos zeólitos, sobressaem-se por apresentar vantagens indiscutíveis, tais como: grande área superficial, porosidade permanente, diferentes topologias, alta estabilidade térmica. Entre as ZIF's, destaca-se a ZIF-8 que vem recentemente sendo utilizada para diversos fins, tais como: constituintes de membranas, troca e armazenagem de gases, biossensores, agentes de catálise e carreadores de fármacos para a formação de DDS (FANG et al., 2015; HARA et al., 2014; KARAGIARIDI et al., 2012; ROCCA; LIN, 2010; VASCONCELOS et al., 2012; XING et al., 2014).

Logo, fica evidente que o desenvolvimento de *DDS* utilizando a ZIF-8 como excipiente inteligente possibilita o carregamento de fármacos, controlando a cinética de liberação do insumo farmacêutico ativo (IFA) a partir de uma forma farmacêutica. Assim, é possível estabelecer níveis plasmáticos terapêuticos constantes, dentro do índice terapêutico, com alta biodisponibilidade e com menores efeitos tóxicos, aspectos importantes para a obtenção de terapias alternativas para a doença de Chagas.



FUNDAMENTAÇÃO

TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As bases que constituíram a fundamentação teórica estão sumarizadas a seguir na forma de um levantamento bibliográfico.

2.1 Doença de Chagas

Descoberta em 1909 pelo médico sanitarista Carlos Chagas, a doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença negligenciada endêmica em 27 países do continente americano. Potencialmente fatal, a doença é causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*. Contudo, por consequência de viagens e imigração, tem-se observado casos em países não endêmicos, como: Estados Unidos da América, Canadá, Japão, Austrália e alguns países da Europa. Sua transmissão exige a participação de um vetor, o triatomíneo, conhecido popularmente pelos nomes: barbeiro, fincão, chupança. O artrópode pertence a classe *Insecta*, ordem *Hemiptua*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatomine* (KROPF; SÁ, 2009; PÉREZ-MOLINA et al., 2013; SOARES SOBRINHO et al., 2007; ZINGALES et al., 2014).

Existem 118 espécies documentadas do inseto vetor, destas, 105 pertencem ao ocidente. Todas essas espécies são hospedeiras em potencial para o *T. cruzi*. Porém, apenas seis têm importância epidemiológica na América do Sul: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *P. megistus* e *Rhodnius prolixus*. A transmissão vetorial é, portanto, a principal via de disseminação da enfermidade, seguida da transfusional, placentária, oral e acidental (COURA, 2015; SANTOS et al., 2012; SOARES SOBRINHO et al., 2007).

A doença de chagas possui uma incidência anual de 28.000 casos na região das Américas e afeta de 7 a 8 milhões de pessoas em todo mundo, com uma taxa de mortalidade de, aproximadamente, 12.000 mortes por ano. Além disso, estima-se que 65 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição e estão em risco de contrair a doença no continente americano. Dentre as doenças negligenciadas, a doença de Chagas é a infecção parasitária com maior impacto socioeconômico na América Latina, sendo responsável por provocar um prejuízo anual de cerca de US\$ 1,2 bilhões referente, principalmente, à perda de produtividade (SANTOS et al., 2012; FÜGI et al., 2014; ZINGALES et al., 2014; WHO, 2015).

A infecção chagásica possui aspectos clínicos bem característicos e distintos, apresentando-se como uma fase aguda que dura em média dois meses, sendo sucedida por uma

fase crônica que tipicamente se prolonga por toda a vida do hospedeiro. Na maioria dos casos, a fase aguda da doença pode ser assintomática ou sintomática. Porém, a sintomatologia dessa fase pode ser confundida com outras enfermidades, não sendo valorizada pelo paciente ou pelo profissional de saúde. Os aspectos clínicos de sua manifestação são difusos, como: quadro febril, miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. No caso de infecção vetorial, esta demonstra manifestações clínicas de sinais de entrada do parasito no organismo e podem persistir por dois meses, os sinais mais comuns são: o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação, o que indica fortes evidências de infecção pelo *T. cruzi* (CUNHA-FILHO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2008; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2014; SOARES-SOBRINHO et al., 2007).

A fase crônica é classificada sob três formas clínicas: indeterminada, cardíaca e digestiva. Os dois a três meses da fase aguda são seguidos por um período longo inicialmente assintomático, sem alterações eletrocardiográficas e/ou radiológicas significativas no coração, esôfago ou cólon, o que foi descrito por Carlos Chagas (1916) como forma crônica indeterminada. A literatura tem mostrado que essa forma da doença de chagas é a mais prevalente dentre os portadores, cerca de 60% (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; CUNHA-FILHO et al., 2012; DIAS et al., 2009).

No entanto, muitos pacientes na forma indeterminada, embora raro, podem evoluir com um mal prognóstico e desenvolverem lesões significativas no sistema cardiovascular e/ou gastrointestinal ou em ambos, caracterizando as formas cardíaca e digestiva, respectivamente da doença de chagas. Dentre os sintomas mais comuns nessa fase, destacam-se: a miocardite grave com cardiomegalia, megaesôfago e megacólon. De acordo com Coura (2012), aproximadamente 40% dos casos da forma indeterminada não evoluem para cardiopatia e as formas de megacólon e megaesôfago. Entretanto, não há nenhum marcador clínico que possa indicar se tal evolução ocorrerá. A taxa de ocorrência dessa evolução é extremamente variável, de 10-60% de uma região para outra (CUNHA-FILHO et al., 2012; DIAS et al., 2009; SOARES-SOBRINHO et al., 2007).

Disfunção gastrointestinal, principalmente megaesôfago, megacólon ou ambos, evoluem em cerca de 10-15% de pacientes na fase crônica. Os casos graves de megaesôfago promovem disfagia com odinofagia, combinada a dor epigástrica, regurgitação e desnutrição. O megacólon afeta o segmento sigmoide, reto ou cólon descendente, ou todos esses simultaneamente, produzindo constipação prolongada, distensão abdominal, podendo, ocasionalmente, causar obstrução intestinal devido ao fecaloma ou vólculo sigmoide. Pacientes com megaesôfago apresentam um aumento da prevalência de câncer de esôfago (COURA;

BORGES-PEREIRA, 2012; MACHADO et al., 2012; MURCIA et al., 2013; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A forma cardíaca é a mais grave e frequente manifestação da doença de Chagas crônica. Desenvolve-se em 20-30% dos indivíduos e, normalmente, leva a anomalias do sistema de condução, bradiarritmias e taquiarritmias, aneurismas apicais, falha cardíaca, tromboembolismo e morte súbita (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; MACHADO et al., 2012; MURCIA et al., 2013; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

2.1.1 Agente etiológico: morfologia e ciclo evolutivo

O *T. cruzi* é um flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma espécie de organela que encerra seu DNA, localizada na mitocôndria. É justamente seu cinetoplasto, grande e volumoso, que o diferencia de outro tripanossomo que infecta hospedeiros em países como Áfricas do Sul e Central, o *Tripanossoma rangeli* (COURA, 2015; DIAS; COURA, 1997; DIAS et al., 2009; SOARES-SOBRINHO et al., 2007).

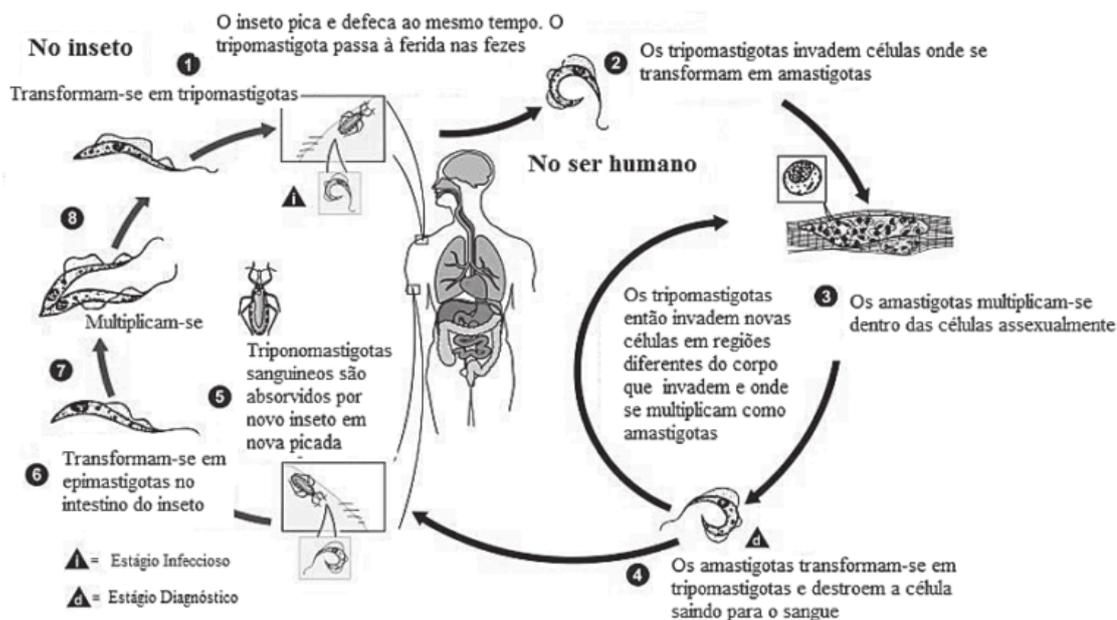
A importância do cinetoplasto ainda reside na diferenciação das formas evolutivas do parasita, baseado na posição da organela em relação ao núcleo e ao flagelo. Na forma infectante, a tripomastigota, o cinetoplasto está situado na parte posterior (posição terminal ou subterminal), de onde o flagelo emerge em uma região denominada bolsa flagelar. Na forma de multiplicação em forma de vetor ou cultura, a epimastigota, o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em uma posição anterior ao núcleo. Já na forma multiplicante no interior da célula-hospedeira, chamada amastigota, possui formato arredondado, com flagelos quase inexistentes, portanto, bastante diferente (COURA, 2015; CUNHA et al., 2011; DIAS; COURA, 1997; SOARES-SOBRINHO et al., 2007).

Dependendo do tipo de *T. cruzi*, é possível verificar casos de polimorfismo o parasito. Este pode ocorrer nas formas delgadas e largas, mostrando as diferentes cepas que podem circular entre os vetores, meio e hospedeiro. Este fato explica diversas características que podem variar entre cepas, tais como: interação célula-hospedeiro, curva de parasitemia e, como evidenciado mais recentemente, resistência a fármacos (DIAS; COURA, 1997; ZINGALES, 2011).

O ciclo evolutivo do parasita, descrito a seguir, está sumarizado na Figura 1. Os vetores invertebrados do *T. cruzi* são insetos hematófago estritos, denominados triatomíneos. Ao ser ingerido pelo inseto, o parasito sofre mudanças irreversíveis ao longo de todo o trato

gastrointestinal. Há, então, a transformação em formas arredondadas (esferomastigoas) e epimastigotas onde, no intestino médio, estas últimas multiplicam-se por todo o trato até atingir o reto, tornando-se tripomastigotas metacíclicos, a serem excretados com os dejetos do animal. Este ciclo pode apresentar fatores influenciantes, tais como: espécie do inseto, cepa do parasita, a quantidade de parasitas ingeridos e até mesmo fatores ambientais (CUNHA et al., 2011; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; DIAS; COURA, 1997).

Figura 1 – Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*



FONTE: CUNHA et al., 2011

Para o desenvolvimento final do parasita é necessária uma célula-hospedeira de um vertebrado. O estágio infectante ocorre em uma grande variedade de células e tecidos, tais como: musculatura lisa e estriada, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos. Dentro da célula-hospedeira, a forma tripomastigota se diferencia em amastigota, após um período de latência de 20 a 30 horas, inicia seu processo de divisão binária intracelular que acontece a cada 12 horas. O número desta última forma pode variar entre 50 a 500, dependendo do tamanho da célula-hospedeira, das características das cepas e da quantidade de tripomastigotas que efetuaram a infecção inicialmente. Uma vez preenchida a célula, as formas agora começam a transformam-se em tripomastigotas (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; DIAS; COURA, 1997; SOUZA; CARVALHO; M., 2013).

Esta célula, então, é lisada para a liberação dos tripomastigotas na circulação sistêmica, a fim de alcançar diferentes órgãos e tecidos. Nestes novos ambientes o ciclo é reiniciado, perpetuando a sobrevivência e evolução do parasita. É esse aumento exponencial da quantidade

de parasitas e de células parasitadas que pode, ora levar o indivíduo à complicações/morte, ora desencadear uma resposta imunológica capaz de reduzir a proliferação do *T. cruzi* (DIAS; COURA, 1997; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010; SOUZA; CARVALHO; M., 2013).

A forma tripomastigota é capaz de infectar células *in vitro* e *in vivo*. Um fato interessante é que as formas epimastigotas são destruídas pelos macrófagos. No entanto, as tripomastigotas interiorizam tais células e continuam com o seu ciclo evolutivo. Essas formas são destruídas apenas quando estão opsonizadas, identificadas por anticorpos específicos da membrana, e assim o macrófago ativado pode reconhecê-las. Fica então claro que os macrófagos têm dualidade comportamental, agindo ora como células-hospedeira, ora como agentes da resposta imune. O processo de interiorização nessas e nas demais células do organismo ocorre por meio da formação de vacúolos provenientes da fagocitose ou pinocitose, onde os parasitas estão encerrados (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010; SOUZA; CARVALHO; M., 2013).

O rompimento do vacúolo fagocitário marca a transformação dos tripomastigotas em amastigotas. Nessa fase 70% dos parasitas ficarão livres no citosol 2 horas após a infecção. Sugere-se que isso ocorre devido a secreção de substâncias ácidas, tais como a hemolisina, que possui atividade máxima em pH 5,5. Estudos mostraram que o rompimento do vacúolo ocorre em torno de pH 6,0 e, com a adição de substâncias um pouco mais básicas (pH 6,2) o escape dos parasitas se apresenta inibido (DIAS; COURA, 1997; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010; SOUZA; CARVALHO; M., 2013).

Contudo, publicações recentes mostram a complexidade da interação parasita-hospedeiro. Outros mecanismos vêm sendo elucidados para explicar o processo de interiorização celular, como é o caso do ácido siálico. Sugere-se que o ácido siálico é um fator bastante importante na infecção do parasita. Entretanto, essa substância não é produzida pelo *T. cruzi*, ela parece ser captada de macromoléculas provenientes de processos de destruição celular (DIAS; COURA, 1997; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010; SOUZA; CARVALHO; M., 2013).

2.1.2 Abordagem clínica do paciente chagásico

Segundo os grandes nomes da literatura científica quando o assunto é doença de Chagas, a abordagem clínica de um paciente chagásico deve seguir um fluxo específico (COURA et al., 2014):

1. Confirmar diagnóstico;
2. Definir a forma clínica da doença;

3. Avaliar o grau do dano;
4. Considerar o prognóstico;
5. Escolher tratamento específico e sintomático de acordo com a atividade do paciente.

O diagnóstico da doença ocorre quando o clínico recebe informações como: sorologia positiva, eletrocardiograma anormal, dispneia ou outros sintomas de insuficiência cardíaca, disfagia ou obstipação prolongada. Ao unir essas informações com os resultados normais advindos dos seguintes testes: eletrocardiograma convencional, telerradiografia do tórax, exame radiológico do esôfago e do intestino grosso; é dado o diagnóstico da forma indeterminada da doença. Esse fato é importante visto o bom prognóstico desta forma clínica (DIAS; COURA, 1997; RIBEIRO et al., 2012).

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 reinfeções; a qualidade das cepas e clones (biodemas); os receptores específicos do hospedeiro; e resposta imunitária inicial do paciente.

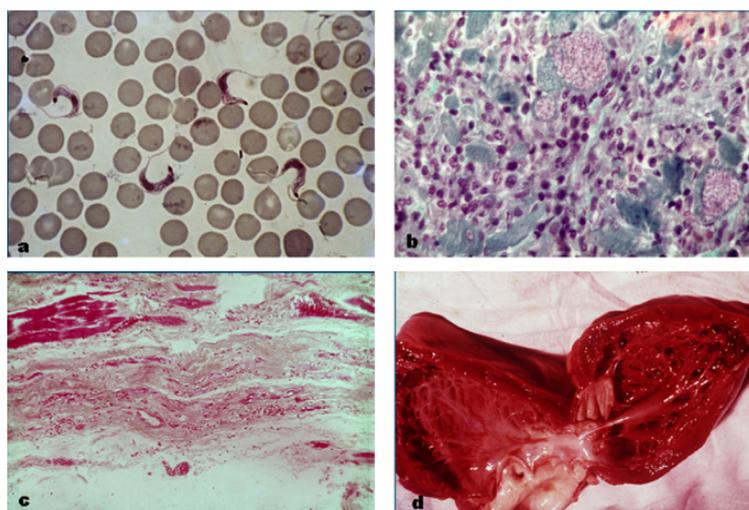
A doença quando transmitida vetorialmente tem duas fases clínicas, aguda e crônica. A fase inicial ou aguda (Figura 2.b) aparece depois de um período de incubação de uma a quatro semanas e os sintomas são evidentes em apenas 5% das pessoas infectadas, com a alta parasitemia e ausência de tratamento, 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, diarreia, periférica hepatomegalia, esplenomegalia ou linfadenopatia. Nesta fase os parasitas são encontrados no sangue (COURA & 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.

Para a confirmação do diagnóstico uma completa anamnese deve ser realizada a fim de verificar: dados epidemiológicos, antecedentes pessoais, quadro clínico e exames complementares. Na fase aguda, busca-se encontrar o parasita no sangue periférico. Essa fase é marcada por uma grande quantidade de parasitas circulantes no sangue periférico do paciente, durante 6 a 8 semanas pós-infecção, antes de estes migrarem para os órgãos que os albergam. A infecção aguda é, portanto, detectada pelo exame à fresco direto ao microscópio, com a visualização dos parasitas nas formas tripomastigotas. Esfregaços hematológico corados também são utilizados e permitem visualizar características morfológicas do parasita, assim como o teste de gota espessa (DIAS; COURA, 1997; MURCIA et al., 2013; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2014).

Na crônica, isso é viável em apenas uma parte dos indivíduos, sendo necessários exames complementares. Contudo, a fase crônica é caracterizada pela baixa parasitemia, logo, os métodos diagnósticos mais precisos baseiam-se na investigação de anticorpos IgG contra os antígenos do *T. cruzi*. Os exames sorológicos são os mais indicados para esse fim, entre eles: imunofluorescências, hemaglutinação indireta, fixação de complemento, ELISA. A repetição destes em diferentes laboratórios é indicada visto a grande quantidade de resultados falso-positivos e falso-negativos. A Reação em Cadeia Polimerase (PCR) possui alta sensibilidade em comparação com outros métodos e, portanto, poderia ser útil para confirmar o diagnóstico em casos de sorologia inconclusiva e como método auxiliar para monitorar o tratamento. Entretanto, a PCR não é comum na rotina de diagnóstico da doença pois, além da necessidade de instalações específicas de laboratório, existe uma pobre padronização, risco potencial de contaminação cruzada de DNA e a ocorrência de diferentes resultados entre laboratórios é comum (DIAS; COURA, 1997; MURCIA et al., 2013; PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2014; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Há ainda métodos parasitológicos indiretos, mais utilizados na fase crônica, devida a escassez de parasitas no sangue de pacientes sorologicamente positivos. O xenodiagnóstico baseia-se na exposição do indivíduo a diversas espécies de triatomíneos, os quais irão fazer o repasto sanguíneo no indivíduo. Posteriormente, os insetos são levados ao laboratório, dessecados ou macerados, colocados em solução fisiológica e examinados ao microscópio em médio aumento para a pesquisa de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (DIAS; COURA, 1997; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; MURCIA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012).

Para a forma congênita da doença, o melhor método de diagnóstico é o hematócrito. O método possui alta sensibilidade e necessita de uma pequena quantidade de sangue. O exame

microscópico do sangue do cordão umbilical ou sangue periférico do recém-nascido por essa técnica é altamente recomendada durante o primeiro mês de vida. Ainda pode ser feita a investigação da presença anticorpos IgG contra os antígenos do *T. cruzi* entre 6 a 9 meses de idade, de preferência no 9º mês, quando a criança não mais possui anticorpos oriundos da mãe (DIAS; COURA, 1997; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; RASSI; RASSI; MARINETO, 2010).

Em seguida, é necessário conhecer a fase da doença e qual a sua forma clínica, partindo do pressuposto que os sistemas mais comumente infectados são o cardíaco, o digestório e o nervoso. Com o advento dos programas de erradicação dos triatomíneos, a ascensão do controle de qualidade das transfusões sanguíneas e a melhoria na qualidade de vida dos pacientes, a fase aguda está sendo cada vez menos incidente. No entanto, é comum o aparecimento de surtos e áreas endêmicas. Contudo, algumas manifestações clínicas devem ser levadas em consideração, tais como: febre sem explicação, taquicardia, micropoliadenia, esplenomegalia e elevada linfocitose. Cabe salientar que, nesta fase, grande parte dos portadores são assintomáticos ou com manifestações não aparentes. O grande problema é, de fato, a fase crônica e a forma indeterminada da doença (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS; COURA, 1997).

Uma vez estabelecida a forma clínica da doença, o clínico deve verificar o grau de dano do portador baseado na seguinte ordem decrescente: cardiopatia, esofagopatia e colopatia. Em seguida, o prognóstico deve ser mensurado. Vale destacar que não há cura espontânea da doença, mas são comuns quadros assintomáticos. São favoráveis os prognósticos da fase aguda em mais de 90% dos casos, mesmo sem a terapêutica medicamentosa. Em menos de 10% dos casos ocorre óbito devido meningo-encefalite (mais comum em pacientes de pouca idade) e cardiopatia grave (como miocardite). Na forma indeterminada da doença ocorre equilíbrio paciente-hospedeiro, onde não há risco de limitações graves ou óbitos pelos próximos 5 a 10 anos. É na fase inicial dessa forma que a cura parasitológica é mais bem observada com o tratamento farmacológico. É aqui que reside a insistência no tratamento de jovens acometidos. O aparecimento de complicações cardíacas em quaisquer fases da doença piora bastante o prognóstico. Após a ratificação de todas as informações supracitadas, deverão ser definidos os tratamentos sintomático e específico (DIAS; COURA, 1997; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; MURCIA et al., 2013).

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; CARDINALLI-NETO, 2009; MORAN et al., 2009).

2.1.3 A terapêutica da doença de Chagas: Benznidazol e o tratamento específico

Os cuidados com o paciente chagásico abrangem desde o tratamento sintomático até o esclarecimento sobre a doença, visando aumentar a adesão ao tratamento. O conhecimento sobre as atividades realizadas pelo portador é imprescindível. A redução das atividades físicas e a readaptação das atividades cotidianas são medidas que visam a diminuição da incidência de complicações cardíacas. Na insuficiência cardíaca congestiva, por exemplo, o indivíduo deve ser aposentado. Em casos de insuficiência cardíaca, deve-se verificar a administração concomitante de medicamentos, tais como: digitálicos, vasodilatadores (enalapril e captopril, principalmente), anti-arrítmicos (amiodarona); e algumas medidas adotadas como: implantação de dieta hipossódica, de marcapasso, correção de hipoxemia e manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico. Algumas medidas mais drásticas apresentam certa discussão da relação risco-benefício. No transplante de coração, por exemplo, é comum a reativação da doença (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS; COURA, 1997; MURCIA et al., 2013).

Até a publicação do "Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas" por Carlos Chagas e com coautoria de seu filho Evandro Chagas, em 1935, não existia nenhum tratamento específico para a tripanossomíase americana. O período que se seguiu entre 1936 e 1960, foi marcado pela avaliação biológica de inúmeros compostos químicos, extratos e misturas. Essa etapa foi marcada por resultados controversos e de significado clínico questionável (DIAS et al., 2009). A última fase, a partir de 1961, é caracterizada por estudos mais contundentes utilizando modelos experimentais de infecção com *T. cruzi* em camundongos, o que demonstrou a eficácia de alguns compostos como, por exemplo, a nitrofurazona (DIAS; COURA, 1997; DIAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2012; SOARES SOBRINHO et al., 2007).

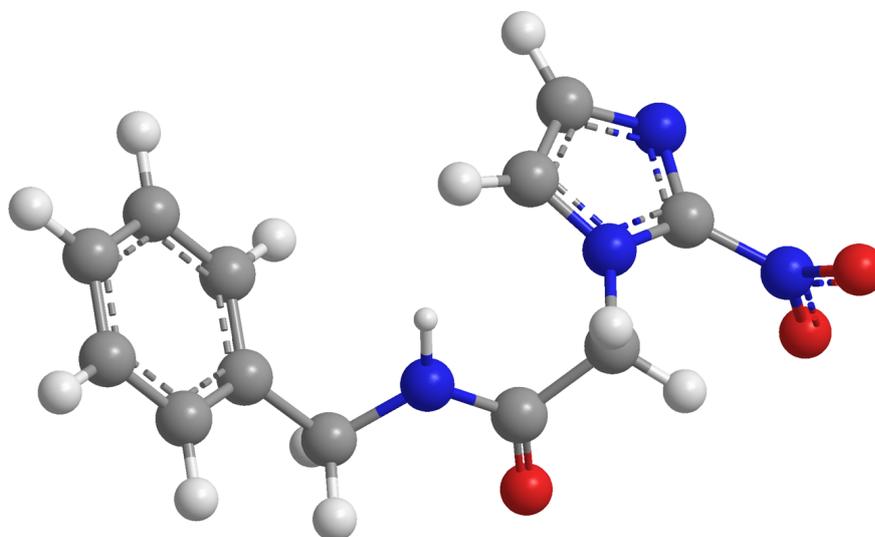
Muitos já foram fármacos que apresentaram atividade anti-parasitária. Entre os agentes quimioterápicos empregados até 1962, estão os derivados de quinolina, outros antimaláricos, os arsenobenzois e outros arsenicais, fenantridinas, os sais de ouro, bismuto, cobre e estanho, iodeto de sódio, violeta de genciana, aminopterina, ácido para-amino-salicílico, ácido nicotínico, anti-histamínicos, sulfonamidas, ACTH, cortisona, anfotericina B, além de mais de 30 antibióticos e algumas nitrofuranos (DIAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, Cançado (1968) realizou uma análise crítica dos estudos e apontou falhas metodológicas na

execução desses, uma vez que os resultados obtidos se demonstraram insatisfatórios, pois se baseavam prioritariamente na redução dos sintomas clínicos, sendo ineficazes para a avaliação do tratamento da doença em sua cronicidade e, portanto, não obtiveram êxito quanto à extinção do parasitismo.

O tratamento específico da doença de Chagas obteve melhores resultados com o lançamento de dois medicamentos, o Nifurtimox, lançado em 1967 pela Bayer (Lampit[®]) e o Benznidazol, lançado em 1972 pela Roche e comercializado no Brasil e Argentina pelos nomes de (Rochagan[®]) e (Radanil[®]), respectivamente (COURA; DE CASTRO, 2002; HONORATO et al., 2014). Desde os anos 80, a comercialização do Nifurtimox foi suspensa, primeiro no Brasil, em seguida, na Argentina, no Chile e Uruguai devido aos efeitos tóxicos da substância (HONORATO et al., 2014).

O BNZ (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida) é um derivado nitroimidazólico (Figura 3) com amplo espectro de atividade farmacológica antiprotozoária e antibacteriana. É uma molécula desprovida de cargas e grupos funcionais ácidos ou básicos na faixa fisiológica de pH (entre 1 a 8) e possui baixa solubilidade em água. Sintetizado em 1972, por Wineholt e Liebman e produzido pelo laboratório Hoffman - La Roche, na Suíça, é efetivo principalmente na fase aguda da doença de chagas. Sua atividade foi observada contra *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma rhodesiense*, *T. congolense* e *T. cruzi*, porém, o interesse clínico restringe-se ao tratamento da doença de Chagas (CANÇADO, 2002; DIAS; COURA, 1997; OLIVEIRA et al., 2008).

Figura 3 – Fórmula estrutural (tridimensional) do benznidazol



FONTE: Autoria própria.

Apesar de ser uma droga conhecida desde a década de 70, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Várias observações na literatura convergem para um mecanismo de ação baseado na formação de metabólitos tóxicos às moléculas do DNA, proteínas e lipídeos do parasita após ativação do pró-fármaco pela nitroredutase tipo I, enzima presente no *T. cruzi* (CAMPOS et al., 2014; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS et al., 2009; POLAK; RICHLE, 1978; TORANZO et al., 1988).

Eficaz contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, estudos sugerem que o BNZ, assim como o nifurtimox, eleva a concentração de ânions superóxidos – radicais livres como: O_2^- e H_2O_2 – e metabólitos nucleofílicos, a nível mitocondrial, através da redução do grupo nitro do fármaco mediada pelas nitroredutases do *T. cruzi*. Isso está relacionado à redução do metabolismo do parasita, pois utiliza o NADH-dependente mitocondrial para a sua ativação como um pró-fármaco. O processo se inicia com a reação catalisada pelo NADPH-citocromo-P450-redutase, que atua sobre o grupo nitro da molécula R-NO₂, levando à produção de um radical ânion nitro intermediário (R-NO₂⁻). Tais radicais têm elevado potencial redox e reagem com o oxigênio molecular, que pode reduzir e regenerar parcialmente o fármaco ou ser reduzido a ânion superóxido (O_2^-) pela transferência de um elétron para o oxigênio no nível do complexo da NADPH-desidrogenase. A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre por dismutação do ânion superóxido. O ânion superóxido e o H_2O_2 , na presença do íon férrico Fe^{3+} , formam o radical livre hidroxila (reação Haber-Weiss). Os radicais livres produzidos, principalmente o OH•, ligam-se a lipídios, proteínas e DNA, lesionando as células. Dessa forma, o fármaco age inibindo a síntese proteica, de DNA e de RNA; estimulam a degradação macromolecular e estimulam a formação de DNA defeituoso no *T. cruzi*. Os parasitas são bastante susceptíveis a esses metabólitos pois há uma redução ou ausência de proteínas sequestradoras de radicais livres (CAMPOS et al., 2014; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS; COURA, 1997; MAYA et al., 2007).

Ainda foi proposto que o BNZ não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesse caso, o radical nitro formado na molécula do BNZ estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi*. Ainda acerca de sua ação farmacológica, é proposto que o BNZ aumenta a fagocitose e a lise do *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama (INF- γ) e inibe o crescimento do parasita através da enzima NADH-fumarato redutase (COURA; DE CASTRO, 2002; DIAS et al., 2009).

Em relação a farmacocinética, a absorção via trato gastrointestinal é rápida, podendo o fármaco atingir concentrações plasmáticas máximas passadas 3 ou 4 horas após administração.

Estudos mostram que, com a administração de um comprimido contendo 100 mg de BNZ possui rápida e completa absorção, atingindo a concentração de 2,2-2,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O fármaco é eliminado, através da biotransformação, na urina dentro de quatro dias. Apenas uma pequena porcentagem é excretada em sua forma inalterada. O fármaco possui meia-vida plasmática dentro de uma faixa de 10,5 a 23,6 horas, com valor médio de 12 horas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; MURCIA et al., 2013; SOARES SOBRINHO et al., 2007).

Um dos maiores problemas do BNZ são os regimes de dosagem que são muito complexos tornando a resistência ao tratamento um problema crescente. Outra limitação importante dessa droga é a sua baixa atividade anti-parasitária quando a doença crônica é diagnosticada. 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 BNZ é classificado como classe II (reduzida solubilidade e alta permeabilidade) de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), 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 BNZ e, eventualmente, aumento da sua biodisponibilidade (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014; TROCHINE et al., 2014).

A dose indicada para crianças está entre 5 a 10 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, por até 60 dias, em 2 ou 3 tomadas (8 em 8 horas), antes das refeições. Para jovens na fase aguda ou na forma indeterminada é de 5 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal, por dia, divididos em duas tomadas, por entre 30 a 60 dias. As crianças parecem ser mais tolerantes ao fármaco. Já foi evidenciada a negatificação parasitológica e sorológica em mais de 60% de indivíduos tratados. O tratamento melhora as manifestações clínicas e costuma curar a meningo-encefalite, considerada fatal sem a administração medicamentosa. Visando profilaxia, a dose de 7 a 8 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal, por dia, durante 10 dias, evita a contaminação acidental pelo *T. cruzi*. Na forma crônica não há evidências da melhora das lesões com a terapia farmacológica. Há ainda a necessidade de se avaliar a alternativa de tratar pacientes portadores da forma indeterminada com lesões cardíaca e digestiva, além de verificar a resistência das cepas ao BNZ. É contraindicada a administração de BNZ em gestantes no primeiro trimestre de gravidez (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS; COURA, 1997; MURCIA et al., 2013).

Estudos clínicos mostram a eficácia do tratamento com BNZ tanto para forma aguda (estimada em 70 a 100% dos casos), quanto para forma crônica da doença (não há consenso para a eficácia do tratamento variando na faixa de 6,0 a 36,5% dos casos). A forma aguda

apresenta cura satisfatória na maior parte dos casos. Muitos dos fracassos terapêuticos da utilização do BNZ decorre da resistência das cepas. O tratamento da forma crônica é, muitas vezes, satisfatório. Ocorre supressão da parasitemia durante a terapêutica, seguida de redução significativa da carga parasitária pós-tratamento. Vale salientar que, mesmo após determinada a cura do paciente portador da forma crônica, é possível evidenciar resultados sorológicos positivos, o que dificulta a disseminação de resultados mais exatos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; MURCIA et al., 2013; SOARES SOBRINHO et al., 2007).

O fármaco é comercializado sob duas apresentações: comprimidos de 100 mg para adultos e de 12,5 mg para recém-nascidos e crianças de até 2 anos. Esta última apresentação teve seu registro concedido em 2011 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fruto de uma parceria entre o LAFEPE e o *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) e foi marcada como um avanço no tratamento de chagas para pacientes pediátricos. Antes desta última apresentação ser introduzida na clínica, o tratamento de pacientes pediátricos era feito fragmentando-se o comprimido de 100mg em até 12 pedaços para que fosse possível a administração das doses recomendadas. Entretanto, este fato trazia muitas complicações para a farmacoterapia, entre eles, erros de dosagens, riscos de efeitos adversos e interrupção do tratamento (DNDi, 2011; SANTOS et al., 2012).

No entanto, apesar de ser o único fármaco disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) para terapia da doença de Chagas no Brasil, o BNZ está longe de ser considerado ideal. O fármaco pode causar reações de toxicidade e efeitos adversos indesejáveis semelhantes ao metronidazol, tais como: náuseas, cefaleia, anorexia, dor abdominal, perda de peso, tontura, astenia, vômitos, erupção cutânea, ataxia. Entretanto, todos estes efeitos são mais leves que os apresentados pelo nifurtimox. Na literatura foi relatado apenas um caso de eritema multiforme e outro de epidermólise tóxica. O BNZ ainda provoca um efeito do tipo dissulfiram com etanol. É comum o aparecimento dessas reações em 10 a 20% dos acometidos. É nesse contexto que vale a pena destacar que o BNZ possui baixo índice terapêutico, o que consiste em dizer que a dose terapêutica é próxima da dose tóxica. Contudo, nestes casos o seu uso ainda não é contraindicado. Entretanto, são três as ocasiões que requerem a descontinuidade do uso (VILLAR et al., 2002)

1. Reação de hipersensibilidade grave: A hipersensibilidade é comum entre os 5-10 primeiros dias do tratamento, podendo ser acompanhada de febre, adenomegalia, dores articulares e musculares, onde o paciente deve interromper o BNZ e ser tratado com corticoesteroides. Essa reação – bem semelhante à observada nos antimicrobianos – é do tipo doença-do-soro: dermatite caracterizada por erupção cutânea acompanhada com edemas

generalizados e enfartamento ganglionar. Isso ocorre devido a combinação do BNZ com uma proteína do tecido ou do soro do paciente. Isso dá origem a um conjunto antigênico, o portador-de-hapteno que, por conseguinte, servirá de alvo para os anticorpos e para a resposta imune. Este tipo de efeito adverso é comprovadamente dose-dependente, sendo mais comum e intenso em doses altas de BNZ. As manifestações clínicas podem levar ao diagnóstico errôneo ao se tratar das reações causadas devido os resquícios do parasita. No entanto, relatos já evidenciaram a presença destes efeitos em indivíduos não-chagásicos, a supressão destes com a parada da tomada do fármaco e a reincidência com a retomada do BNZ. Contudo, a dose de $5 \text{ mg.Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, por durante 60 dias, reduz a incidência do aparecimento das reações de hipersensibilidade (ALTCHEH et al., 2011; CARRILERO et al., 2011; DIAS; COURA, 1997; PINAZO et al., 2013; PONTES et al., 2010);

2. Depressão da medula óssea (neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica). Este efeito parece ser mediado devido ao núcleo farmacofórico da molécula, uma vez que outro derivado, o metronidazol, demonstrou os mesmos efeitos. É importante salientar ao paciente que, a qualquer sintoma de febre e dor de garganta, o tratamento deve ser descontinuado e o médico deverá ser consultado. A púrpura citopênica também pode ocorrer, mas é muito mais rara. Até hoje um único caso foi evidenciado (mulher, 58 anos, posologia de 400 mg.Kg^{-1} , interrompendo tratamento do 11º dia, quando foi constatada a presença de petéquias e bolhas hemorrágicas na mucosa bucal. Isso parece acontecer devido destruição plaquetária mediada por resposta imune) (ALTCHEH et al., 2011; CARRILERO et al., 2011; DIAS; COURA, 1997; PINAZO et al., 2013; PONTES et al., 2010);

3. Polineuropatia periférica. A polineuropatia é dose-dependente e costuma aparecer no final do tratamento em pacientes que o armazenamento da droga a ponto de atingir doses tóxicas, muito próximas das doses terapêuticas (geralmente, a partir de 15g). Com o acometimento, os pacientes relatam dores ao cortar as unhas e desconforto ao lavar as mãos em água gelada. As doses cumulativas e/ou a reincidência do tratamento pode dar origem a sérios danos, irreversíveis, como casos de parestesia. Entretanto, diferente dos já mencionados efeitos adversos, a polineurite é previsível e, portanto, pode ser evitada mais facilmente (ALTCHEH et al., 2011; CARRILERO et al., 2011; DIAS; COURA, 1997; PINAZO et al., 2013; PONTES et al., 2010);

Alguns dados relacionados ao uso do BNZ e seu potencial mutagênico, semelhante ao metronidazol, já foram relatados em células, ratos e coelhos. Em humanos, há poucas pesquisas sistematizadas e que, portanto, trazem resultados inconclusivos para qualquer presunção. Em testes de aberrações cromossômicas e indução de micronúcleos em culturas de linfócitos

periféricos de crianças com doença de Chagas, foi observado um aumento de linfócitos micronucleados interfásicos e de aberrações cromossômicas após o tratamento com BNZ (VILLAR et al., 2002). Dados, ainda não conclusivos, mostraram a possibilidade do efeito clastogênico com a administração de BNZ. Isso foi relatado devido a alta produção de micronúcleos e ao aumento da expressão de sítios frágeis e pontos de rotura específicas do câncer (ALTCHEH et al., 2011; CARRILERO et al., 2011; DIAS; COURA, 1997; PINAZO et al., 2013; PONTES et al., 2010).

O setor de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) de medicamentos para combater a doença de Chagas evolui a passos lentos. O atual tratamento com o BNZ possui vários inconvenientes. Além de ser um fármaco rudimentar, o fármaco possui diversas limitações que acabam por prejudicar o tratamento dos pacientes chagásicos. Dentre as limitações mais comuns, encontra-se o fato do BNZ ser eficaz apenas na fase aguda da doença e praticamente ineficaz na fase crônica. Outro entrave pertence a etapa biofarmacêutica do desenvolvimento de medicamentos, uma vez que o BNZ pertence a SCB de classe II. Isto implica em problemas como a redução da biodisponibilidade e a dificuldade no desenvolvimento farmacotécnico de novas formas farmacêuticas. É justamente esta baixa biodisponibilidade que promove o surgimento de vários efeitos adversos decorrentes das altas doses administradas. Tem-se então a justificativa da necessidade de inovação no tratamento alternativa de doenças negligenciadas (CUNHA et al., 2011; CUNHA-FILHO et al., 2012; DIAS et al., 2009; MURCIA et al., 2013; DIAS; COURA; YASUDA, 2014; OLIVEIRA et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2007).

Contudo, os grandes centros mundiais de PD&I não se interessam em investir em produtos que não oferecem lucro, como é o caso da obtenção de medicamentos para doenças consideradas não geradoras de receitas, as doenças negligenciadas. Exemplo bem característico deste fato foi o que ocorreu em 2003, quando o laboratório suíço Roche[®] anunciou a doação ao governo brasileiro do direito de patente e transferência da tecnologia do medicamento Rochagan[®], contendo como IFA, o BNZ. A Roche[®] alegou que a lucratividade com a sua produção não atendia às expectativas do laboratório. Dessa forma, o governo brasileiro concedeu ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) o direito de produzir o medicamento, que ocorre até então (FIOCRUZ, 2013; CUNHA-FILHO et al., 2012; SANTOS et al., 2012; SOARES SOBRINHO et al., 2007).

Os anos que se seguiram após a doação da patente e a transferência de tecnologia para o LAFEPE foram marcados por vários impasses, tais como: o aumento da escala de produção; a dificuldade na aquisição da matéria-prima que não estava mais sendo fornecida pelo ex-

produtor (Roche ®), a exportação do produto para outros países e os altos preços finais após a distribuição na América Latina, Estados Unidos da América e Europa (DIAS; COURA; YASUDA, 2014).

2.2 Tecnologia Farmacêutica: Inovação aplicada ao benznidazol

Apesar do BNZ não ser o fármaco ideal, devido à sua toxicidade e baixa solubilidade em água, o uso de alternativas tecnológicas tem sido particularmente interessante devido às melhorias apresentadas, tais como: aumento da solubilidade, dissolução dos fármacos pouco solúveis e conseqüentemente melhora da sua biodisponibilidade, redução de efeitos colaterais, melhor custo-benefício. Neste tocante, a seguir são listados alguns estudos que comprovam que algumas técnicas como dispersões sólidas, complexos de inclusão e outros carreadores são alternativas viáveis para o BNZ (LYRA, 2009; LIMA et al., 2011; SOARES-SOBRINHO et al., 2012).

As Dispersões Sólidas (DS) são sistemas no qual o fármaco encontra-se disperso em uma matriz ou carreador, cujo objetivo é melhorar a biodisponibilidade oral e a solubilidade de fármacos hidrofóbicos (LIMA et al., 2011). Polímeros solúveis em água têm sido bastante utilizados como carreadores de fármacos. Entre os exemplos estão o polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG), que têm sido largamente empregados nestes sistemas devido aos seus baixos custos e alta afinidade à água (SOARES-SOBRINHO et al, 2012).

Nos estudos de Lima e colaboradores (2011) foi possível observar que a taxa de dissolução do BNZ isolado foi lenta, sendo menos de 10% dissolvido em 1h. Nas misturas físicas (MF) obtidas do BNZ com PVP e PEG, a taxa de dissolução apresentou-se mais elevada, quando comparada ao fármaco isolado. Isso demonstra o incremento na taxa de dissolução, principalmente devido ao efeito hidrofílico dos carreadores, determinando assim um aumento na taxa de dissolução. O trabalho evidenciou o aumento da solubilidade do BNZ em DS utilizando os polímeros PVP K30 e PEG 6000, comprovando o aumento da taxa de solubilidade e dissolução do BNZ. Os resultados do estudo demonstram que DS são bastante eficazes na melhoria das propriedades do BNZ, como no aumento das solubilidade e dissolução do BNZ, e conseqüente melhora na biodisponibilidade oral.

Fonseca-Berzal e colaboradores (2015) realizaram um estudo com DS de BNZ em desoxicolato de sódio (NADC) visando a melhoria da solubilidade e biodisponibilidade deste fármaco. A partir dos resultados dos perfis de dissolução o BNZ matéria-prima, mostrou uma taxa rápida de $90,04 \pm 3,81\%$ em 60 min. Para a DS produzida (R-BNZ), a taxa foi mais rápida

no início dos testes e em 30 min foram observadas as diferenças significativas ($P < 0,05$) entre BNZ ($70,82 \pm 2,88\%$) e R-BNZ ($91,65 \pm 4,20\%$). Porém, após 60 min ambos apresentaram resultados semelhantes ($90,04 \pm 3,81\%$ em BNZ isolado e $92,94 \pm 5,05\%$ para R-BNZ).

Os perfis de dissolução do BNZ associado ao NADC, mostraram que a velocidade de dissolução diminuiu com o aumento de NADC. Entretanto, nas DS as taxas foram mais rápidas do que quando comparadas as misturas físicas. O trabalho ainda destacou a importância dos processos de secagem. Devido a menor cristalinidade e tamanho de partícula inferior após o processo de recristalização, a taxa de dissolução das dispersões sólidas foi mais rápida do que das misturas físicas (FONSECA-BERZAL et al., 2015)

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir do amido com uma cavidade hidrofóbica e uma superfície exterior hidrofílica. Estes materiais são amplamente utilizados para formar complexos de inclusão dinâmicos não-covalentes com drogas fracamente solúveis em água, aumentando assim a sua solubilidade em água e biodisponibilidade oral aparente, especialmente para a classe II (como é o caso do BNZ) e classe IV do SCB (LYRA, 2010; PÁPAY et al., 2016)

Leonardi e colaboradores (2013), avaliaram a influência de complexos de inclusão (CI) à base de BNZ e betaciclodextrina (β CD), sobre a solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade do BNZ. Após várias caracterizações, os pesquisadores observaram que a solubilidade do BNZ aumentou linearmente com a concentração de β CD, sugerindo assim que os complexos foram obtidos na proporção estequiométrica de 1:1. A solubilidade do BNZ aumentou de 0,71 mM a cerca de 2,87 mM devido o aumento da β CD, uma vez que foram formado complexos solúveis em água. O trabalho ainda evidenciou que a adição de um radical metil na β CD reforçou a capacidade de complexação com o BNZ, e assim a taxa de dissolução ficou entre 72% e 90% BNZ dissolvido em 10 min, diferente do BNZ isolado que apresentou 21% no mesmo intervalo de tempo. Estes resultados demonstram que houve um aumento considerável na solubilidade do fármaco e da taxa de dissolução com a obtenção de CI.

Além destes sistemas, recentemente a tecnologia farmacêutica vem aplicando diferentes formulações e carreadores a fim de atribuir melhorias aos impasses apresentados pelo BNZ e desenvolver tratamentos alternativos à doença de Chagas. Alguns exemplos são listados a seguir.

Lamas e colaboradores (2006), elaboraram um estudo com lipossomas carreadores do BNZ, visando o desenvolvimento de uma forma farmacêutica parenteral capaz de melhorar a solubilidade do BNZ em água, assim como reduzir a sua toxicidade. Porém a desvantagem do

estudo foi a administração endovenosa e o incômodo para o paciente em tratamentos prolongados (LAMAS et al., 2006).

Dependendo de alguns fatores referentes à relação entre a molécula hóspede e a hospedeira, tais como: forma, tamanho, interações; a presença de um terceiro componente a sistemas triviais pode dar origem a um novo material com diferentes constantes de associação. Estes são geralmente obtidos à base de um fármaco, CD e a adição de um polímero hidrossolúvel, comumente utilizado como excipiente farmacêutico. A estes materiais, dá-se o nome de sistemas multicomponentes. Porém, apesar da inovação da obtenção destes materiais, as situações devem ser estudadas caso-a-caso, uma vez que o sistema ternário pode aumentar ou diminuir as estabilidades físico-química e microbiológica sistemas. Alguns exemplos destes sistemas estão descritos a seguir (ANDREAUS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2005).

Soares-Sobrinho e colaboradores (2012) desenvolveram e caracterizaram sistemas binários e ternários de BNZ. Para os CI foi utilizada a metil-betaciclodextrina randomizada (RM β CD) e para o sistema multicomponente foi adicionado um polímero hidrossolúvel: PVP ou HPMC. Os resultados mostraram um aumento da taxa de dissolução do BNZ em um sistema binário com a RM β CD na proporção de 1:0,17, o que se adequa ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica oral sólida, devido a baixa concentração da CD e a possibilidade da obtenção de escala industrial. Embora o melhor sistema multicomponente obtido utilizando apenas 0,1% de HPMC tenha apresentado ótima dissolução em meio líquido, o mesmo comportamento não foi observado no estado sólido. O sistema ternário não apresentou diferença estatística em relação ao CI obtido. Desta forma, os pesquisadores sugeriram a formação de um CI à base de BNZ:RM β CD obtido por malaxagem como o método mais adequado para a produção industrial de uma terapia alternativa para a doença de Chagas com perfil de dissolução mais eficaz.

Melo e colaboradores (2013) promoveram a formação de sistemas multicomponentes à base de BNZ, β CD e polímeros formadores de DS. Os pesquisadores observaram que alguns estudos utilizando CI à base de BNZ:CD não traziam resultados significativos no tocante do incremento da solubilidade aquosa do BNZ e que, quando formados, os mecanismos de interação entre BNZ-CD não eram claramente elucidados. Desta forma, o trabalho consistiu em um estudo do mecanismo de interação entre sete diferentes polímeros hidrofílicos e a trietanolamina (TEA) em solução aquosa contendo β CD. Dentre os polímeros utilizados: PEG 1500, 4000 e 10000; hidroxipropilmetilcelulose (HPMC); álcool polivinílico (PVA); polivinilpirrolidona (PVP) e o poloxâmero 407.

Os resultados evidenciaram um incremento na solubilidade aquosa do BNZ em diferentes valores de pH na formação de CI, em que o meio ácido mostrou-se mais favorável. Quando em proporções estequiométricas de BNZ: β CD:TEA a solubilidade dos complexos é limitada. Em concentrações de TEA mais baixas, foi observada a diminuição da solubilidade do BNZ devido ao deslocamento do equilíbrio para a dissociação do complexo BNZ: β CD. Quando em concentrações mais elevadas de TEA, observou-se um incremento de solubilidade do BNZ. A associação de diferentes polímeros hidrofílicos contribuiu para a estabilização dos complexos formados, em que POL 407 e PVA aumentaram a constante de estabilidade K_1 , levando ao aumento da interação BNZ: β CD. Além disso, os sistemas ternários foram capazes de aumentar a variação de entropia, aumentando a estabilidade do complexo.

Outro fator a ser explorado é a aplicação de PD&I na obtenção tecnológica de “novas” formas farmacêuticas. Estas têm o intuito de oferecer alternativas de tratamento, atender às necessidades especiais de pacientes especiais, principalmente crianças e idosos, que podem apresentar dificuldades em aderir ao tratamento convencional. Isto é de suma importância devido à dificuldade do tratamento, ainda incerto, da fase crônica da doença de Chagas e seus efeitos colaterais associados.

Neste contexto, Maximiliano (2011) realizou técnicas de recristalização espontânea do BNZ estabilizado por agentes hidrofílicos, em escala nanoparticular ou microparticular, como alternativa promissora para a obtenção de materiais com tamanho de partículas bastante reduzido, homogêneo e de baixa coesividade, resultando em incrementos na velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis em água. Os resultados do teste de dissolução demonstraram que as formulações obtidas de microcristais de BNZ, atingiram 85% de dissolução em 10 minutos estando dentro dos critérios farmacopeicos para formas farmacêuticas de liberação imediata (MAXIMIANO et al., 2010).

Manarin e colaboradores (2013), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia terapêutica do BNZ em solução, visto que não existem formas de dosagem líquidas comerciais disponíveis. Foram preparadas três formulações líquidas de BNZ nas dosagens de 20, 40, 60 mg.Kg⁻¹ de peso corporal em pH 2,5 em uma mistura PEG 400 e água. A eficácia destas soluções foi avaliada em ratos. O tratamento oral de ratos com BNZ levou a uma significativa redução da parasitemia ao fim do experimento de 14 dias, em comparação com os ratos não tratados. O sistema de co-solvente água e PEG 400 em pH ácido demonstrou-se bastante útil em melhorar a solubilidade do BNZ. A eficácia das novas soluções de BNZ foi a mesma que a observada no fármaco em suspensão, a vantagem é que minimiza os erros de dosagem pois não necessita da etapa de fragmentação de uma forma farmacêutica sólida.

2.3 *Metal Organic Frameworks* e suas aplicações como excipientes inovadores

Em 1957, os excipientes foram definidos como “a substância utilizada como um meio para obter um medicamento”, isto é, um material com simples 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 (GARCÍA-ARIETA, 2014). Porém nos últimos anos tem se percebido 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 drogas, mas também impacto significativo sobre a sua biodisponibilidade, toxicidade, estabilidade e eficácia (ZHENHAO et al., 2011).

Novas tecnologias de fabricação de excipientes vem sendo realizadas para melhorar a liberação, dissolução e absorção de drogas de baixa solubilidade. A tecnologia farmacêutica moderna também requer a verificação do estado físico do excipiente, importante tanto na fase de fabrico como no controle da liberação 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 nanoambientes têm atraído grande interesse para aplicações biomédicas, uma vez que pode induzir efeitos terapêuticos sinérgicos. Um método utilizado é o aprisionamento por difusão Fickiana, em que o princípio ativo, inicialmente, é dissolvido em 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; GARCÍA-ARIETA, 2014).

Atualmente a busca por tratamentos de antigas e novas doenças continua e tecnologias têm sido desenvolvidas para melhorar o transporte e as propriedades de fármacos não só para o tratamento destas enfermidades. Como exemplo destas tecnologias, destacam-se: pró-drogas,

lipossomas, biopolímeros, nanopartículas, ciclodextrinas e recentemente as *Metal-Organic Frameworks* (MOF's).

Desde 2009, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) vem desenvolvendo um projeto para a harmonização das terminologias e nomenclaturas na área de polímeros de coordenação. A razão disto é o grande interesse nestes materiais, a diversidade dos pesquisadores envolvidos em diversas áreas e um número exacerbado de abreviaturas, o que causa muita confusão e conflitos desnecessários. O objetivo é gerar um sistema regulado para nomear e analisar determinados materiais que, posteriormente, deverá receber a colaboração da *International Union of Crystallography* (IUPAC, 2016).

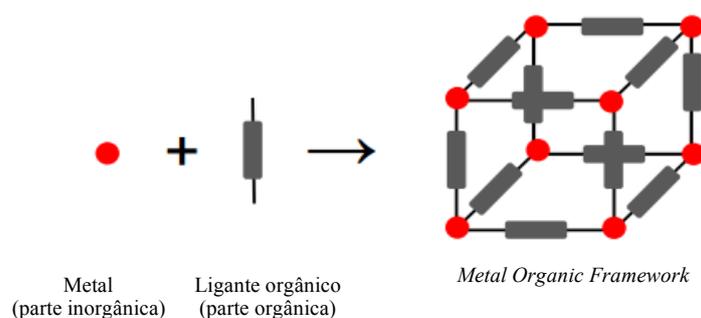
Em dezembro de 2014, esta força-tarefa multinacional de pesquisadores finalmente harmonizaram o conceito de MOF's. Desta forma, definiu-se este material como um polímero de coordenação formado por um arcabouço metal-orgânico, com potenciais poros e canais. Esta rede, por sua vez, é definida como uma entidade de coordenação formada por células unitárias que se repetem em uma dimensão e que forma ligações cruzadas entre duas ou mais cadeias interindividuais estendendo-se em 1, 2 ou 3 dimensões (IUPAC 2016; ALEXEEV et al., 2010; FERREIRA, 2014).

Segundo as próprias recomendações da IUPAC acerca da nomenclatura na área da química inorgânica, uma entidade de coordenação corresponde a uma molécula iônica ou neutra, composta por um átomo central, geralmente um metal, ao qual está ligada uma matriz em torno de átomos ou grupos de átomos, cada um destes denominados *linkers* (ligantes). A estrutura da MOF torna-se estável devido às interações coordenativas de ácidos e bases de Lewis, com base na doação de um par de elétrons livres e na recepção por um átomo com orbital vazio (JENSEN, 1980; FERREIRA, 2014). Estas definições encontram-se em consonância com o a *Commission on Metal Organic Frameworks* (IUPAC, 2005; FERREIRA, 2014; IUPAC, 2016).

A partir dos centros de coordenação, é possível expandir esta estrutura adicionando íons ou moléculas capazes de formar ligações entre dois ou mais metais, obtendo um polímero em mais de uma dimensão. Um exemplo bem característico desta natureza é o azul da Prússia, de fórmula $\text{Fe}_3^4 [\text{Fe}^2(\text{CN})_6]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$, um dos primeiros pigmentos a ser sintetizado, onde cada íon cianeto liga-se em ponte a dois íons de ferro de diferentes valências através dos átomos C e N (COOK et al., 2013; FERREIRA, 2014).

MOF é, portanto, uma subclasse dos polímeros de coordenação (Figura 4). Este material é uma espécie de matriz polimérica, possui propriedade cristalina com uma grande área superficial específica, uniformidade de tamanho de poros e diferentes topologias, definidas a depender dos tipos de metal e *linkers* escolhidos. As MOF's possuem as mais variadas funcionalidades, possuindo aplicações em diversas áreas, tais como: adsorção de substâncias, membranas de troca de substâncias (CACHO-BAILO et al., 2014), catálise (YU et al., 2015; ZHU et al., 2013) , separação e armazenamento de gases e vapores (HARA et al., 2014) e componentes DDS (DANTAS RAMOS; TANASE; ROTHENBERG, 2014; LIÉDANA et al., 2012; REN et al., 2014b; RODRIGUES et al., 2012; ZORNOZA et al., 2013)

Figura 4 – Representação esquemática que mostra a construção da MOF, demonstrando a parte inorgânica, a parte orgânica e uma das topologias da MOF como produto.



Fonte: SHAHID, 2015.

Assim, 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 uma grande quantidade de aporte de fármacos, enquanto que os grupos inorgânicos podem ser controladores de liberação modulada. Essas estruturas adsorventes de baixa densidade (entre $0,2-1 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$) têm sido submetidas a investigação intensa sobre a sua utilização em processos de catálise, magnetismo, luminescência, sensores, como material de armazenamento e liberação 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; SEDA; KIZILEL, 2010; LEE; LI; JAGIELLO, 2005; LEI et al., 2014).

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, principalmente por reduzir o efeito *burst* de liberação e, com isso, melhorar a qualidade de vida das pessoas que necessitam desses tratamentos. Vale salientar, que essas novas tecnologias são esforços 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).

Embora seja difícil determinar a pioneira síntese destes materiais, um recente interesse surgiu 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 despertou o interesse em materiais nanoporosos tradicionais em muitos campos científicos e industriais. Ao longo dos últimos oito anos, várias MOF's vem sendo investigadas para aplicações na incorporação e liberação de vários fármacos, visando obter transportadores que apresentem pouca toxicidade no organismo e biocompatibilidade tanto do metal de transição como do *linker*. A conectividade de rede com as 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 ($500-4500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) 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 (FANG et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012; ROWSELL; YAGHI, 2004; VASCONCELOS et al., 2012).

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 porosidade 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, intercrecidas 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. No entanto, o uso de micro-ondas, ultrassons, radiação eletromagnética, além do uso de métodos eletroquímicos e mecanoquímicos, também já foram mencionados (STOCK & BISWAS, 2012)). Uma questão importante é a ativação da MOF após a síntese, pois solventes utilizados durante a mesma geralmente permanecem nos poros dos materiais (ROSSEINSKY, 2004). A ativação por aquecimento é necessária para remover as 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 os íons metálicos. Autores costumam realizar a ativação da MOF na faixa de 100-160 °C *overnight* (LIÉDANA et al., 2012).

Pioneiros em investigar o uso de MOF's como um sistema carreador de fármacos ou DDS, o grupo de Férey e seus colaboradores usaram os Materiais do Instituto Lavoisier (MIL), desenvolvidos a partir de centros de metal trivalente e ácidos carboxílicos como *linkers* e foi uma grande promessa devido as suas características atraentes: poros grandes (25-34 Å), grandes áreas de superfície (3100-5900 m².g⁻¹), e a capacidade de incorporar grupos funcionais na estrutura, por meio de interações não covalentes (HORCAJADA et al., 2006; HUXFORD; ROCCA; LIN, 2010).

Horcajada e colaboradores (2006) utilizaram MOF's à base Ferro (III) poroso e não-tóxico e o anti-inflamatório não-esteroidal ibuprofeno (HORCAJADA et al., 2006). Mais tarde, Lin e colaboradores (2009) relataram um fármaco à base de platina em nanoescala enxertando-o como um precursor para a criação da estrutura de um polímero. Nestes trabalhos foi observado que houve diferença na adsorção dos referidos fármacos, devido a diferença nos tamanhos dos poros, resultado da presença de ligantes diferentes nas redes (LIN; RIETER; TAYLOR, 2009). 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 droga 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 MOFs são formadas pelo mesmo ligante, variando apenas o metal (HORCAJADA et al., 2007; HUXFORD; DELLA ROCCA; LIN, 2010; ROCCA; LIN, 2010).

Mais tarde, Horcajada e colaboradores (2010) evidenciaram que determinadas nano-MOF's são capazes de adsorver e, posteriormente, liberar fármacos, tornando-se carreadores não-tóxicos. Até agora, viu-se que apenas uma parcela de MOF's permite a carga de uma grande

quantidade de fármacos, com tempo de modulação de liberação entre 6 a 23 dias (HUXFORD; DELLA ROCCA; LIN, 2010).

Zhao e colaboradores (2011) desenvolveram um coloide através da funcionalização de superfície com polímeros hidrofílicos. Nesta *short communication*, os pesquisadores relataram uma MOF coberta com grupos alcinos e com sua superfície acrescida, por enxertia, de polietilenoglicol (PEG) azido-terminais, um polímero hidrofílico. O objetivo da técnica foi superar os limites de materiais porosos no que tange sua hidrofobicidade que acaba por dificultar suas aplicações em soluções aquosas. Após a PEGilação, os pesquisadores desenvolveram um DDS carreando o fármaco anticâncer 5-fluoracil (5-FU). A formação deste sistema ainda possibilitou uma nova aplicação da MOF na imagiologia de ressonância magnética devido ao paramagnetismo exibido pelo Cu^{2+} adotado como porção inorgânica da MOF.

Neste estudo os pesquisadores realizaram o estudo de liberação do 5-FU através de diálise em meio tampão-fosfato (pH 7,4) a 25 °C. Em 2 horas foi possível observar a liberação de 20% do fármaco em efeito *burst*, onde grande parcela deste estava, de fato, ligado à MOF (4,38%), com subsequente liberação lenta até 24 horas. Em contraste, quando o fármaco isolado foi avaliado, 90% do 5-FU foi liberado em apenas 7 horas. Em relação a liberação do fármaco a partir da MOF, a rápida liberação até duas horas se deu, provavelmente, devido a ligação do fármaco ao PEG. Já em relação à liberação controlada até 24 horas, os pesquisadores suregiram que a lenta difusão ocorre devido à forte interação entre os sítios de ácidos de Lewis entre o átomo de cobre e o 5-FU (ZHAO et al., 2011).

Li e colaboradores (2015) realizaram o estudo de liberação do 5-FU associado a uma MOF como uma topografia inédita, a partir de diálise em meio tampão fosfato salino (pH 7,4) a 37 °C. Foi observada a liberação de 92% do fármaco no fim de 120 horas, exibindo uma liberação lenta. Os autores sugerem que essa lenta liberação está ligada ao grande potencial de formação de ligações de hidrogênio entre o 5-FU e a MOF. Os testes mostraram uma liberação de 50% em etapas iniciais (30 horas), com o aparecimento de uma acentuada e mais rápida liberação do fármaco a partir de 72 horas, caracterizada pela degradação da rede, o que foi posteriormente corroborado pelo difratograma da amostra.

Por se tratar de um material híbrido, composto por material inorgânico, uma propriedade das MOF que deve ser levada em consideração é a toxicologia. A 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 corresponde a 22 µg do sangue, ao passo que outros, tais como cobre (68 µg), manganês (180 µg), zinco (180 µg), e níquel (2 µg) são encontrados nos tecidos. 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).

A geometria e o tamanho de poros das MOF's faz com que elas sejam materiais promissores para o desenvolvimento de DDS. Entretanto, a porção inorgânica dessas moléculas híbridas – metais como Cr^{3+} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{2+} - trazem certo risco tóxico, o que dificulta as aplicações *in vivo* destes materiais (ZHAO et al., 2011). Desta forma, é de suma importância que se conheça a segurança destes novos materiais a ser utilizados como sistemas carreadores de fármacos (PEIKERT et al., 2015).

Muitos autores utilizam o conceito de ingestão tolerável para metais não-tóxicos ou para aqueles que já são encontrados em quantidades significantes no organismo, tais como: ferro, zinco, cobalto, manganês, cálcio (MA; MOULTON, 2011; PEIKERT et al., 2015). Logo, os sistemas devem ser formulados com concentrações abaixo deste limite visando reduzir os riscos do acometimento de efeitos adversos à saúde do indivíduo. A seguir serão listadas algumas investigações sobre o potencial tóxico de determinadas MOF's.

Os efeitos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* de MOF's com carboxilato de ferro (Fe-MIL-88A), por exemplo, foram investigados e os resultados foram animadores. No teste da análise da toxicidade à exposição aguda ou subaguda, com doses muito elevadas (até 220 mg.kg⁻¹), de três diferentes MOF's com carboxilato de ferro administrados por via intravenosa em ratos, nenhum efeito tóxico foi observado (HINKS et al., 2010; HORCAJADA et al., 2007)

Mais adiante os pesquisadores foram capazes de detectar o metabolismo destes materiais. Eles verificaram que o ferro é rapidamente captado pelo fígado e baço, sendo biodegradado e posteriormente excretado pela via renal e/ou fecal, também sem efeitos nocivos ao corpo. Corroborando estes resultados favoráveis, vale mencionar o exemplo da aprovação do suplemento de ferro por via oral, fumarato de ferro, que tem composição química semelhante à MOF Fe-MIL-88A. Logo, a aprovação deste produto também indica que a composição MOF é susceptível à eliminação segura pelo organismo. Os estudos de toxicologia das MOF's: Fe-MIL-101 e Fe-MIL-88, injetadas em ratos, indicam resultados semelhantes, não sendo observados efeitos deletérios mesmo após vários meses de exposição crônica (HINKS et al., 2010; HORCAJADA et al., 2007).

As MOF's que possuem o zinco em sua composição também têm os seus efeitos tóxicos bastante estudados. O zinco é um dos principais metais de transição que controlam a homeostase do sistema nervoso central, perdendo apenas para o ferro. Entretanto, possui efeito dose-dependente, sendo um importante neuromodulador em baixas dosagens ou um agente causador de morte neuronal em concentrações elevadas (CAPASSO et al., 2005; CHERNY et al., 2001; REN et al., 2014a). Em contraste, Brewer e colaboradores (2010) mostraram que baixas dosagens de zinco em humanos e roedores estão relacionadas à doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Logo, fica evidente o fino ajuste que deve ser realizado visando o controle da concentração plasmática de zinco (BREWER et al., 2010).

Além disso, uma possível rota de influxo Zn^2 em células PC12 foi relatada. Estudos recentes mostraram a endocitose de moléculas de óxido de zinco, capaz de adentrar os neurônios e se dissociar em baixo pH liberando íons zinco no citosol, contribuindo ainda mais para a toxicologia destes materiais (KAO et al., 2012). Assim, pode-se esperar que estes novos materiais possam sofrer endocitose, em seguida liberem no interior da célula os íons zinco e que isso promova um acréscimo deletério às concentrações de zinco. Este fato levou Ren e colaboradores (2014) a avaliarem o potencial citotóxico de materiais que contêm zinco em sua composição (CORNIOLA et al., 2008; PAVLICA; GEBHARDT, 2010; REN et al., 2014a).

Os pesquisadores analisaram o efeito da toxicidade da MOF isoreticular (IRMOF) em nanoescala composta por íons de zinco (IRMOF-3), utilizando a linhagem PC12 – de células de feocromocitomas de rato –, as quais se comportam como células neuronais quando expostas ao fator de crescimento nervoso (NGF). O estudo foi realizado com concentrações de 25, 100 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IRMOF-3 e a citotoxicidade foi avaliada pro meio de teste de viabilidade celular através do método MTT. Os ensaios verificaram que a concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não afetou a viabilidade celular, enquanto que a concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveu um forte efeito tóxico nas células, reduzindo a viabilidade a 33,79% após 48 horas de ensaio. Os pesquisadores ainda observaram danos à parede celular, mesmo à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, além da internalização de uma pequena parcela da IRMOF-3 administrada (REN et al., 2014a).

Neste mesmo estudo foi realizada a análise comparativa da toxicidade entre os íons de zinco – produto tóxico da IRMOF-3 após a sua degradação – e a própria MOF. Os pesquisadores verificaram que os efeitos tóxicos da IRMOF-3 foram mais brandos que os provocados pelo metal isolado. A 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a MOF apresentou diferenciação normal das células PC12. Já a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram observadas alterações drásticas na indução da

diferenciação destas células. Os íons zinco demonstraram significativa toxicidade às células PC12, inibindo consideravelmente o potencial indutivo das células, ainda em maior proporção do que a IRMOF-3 correspondente. As concentrações de 100 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ainda apresentaram a redução dos filamentos de actina e tubulina, responsáveis pela manutenção da estrutura do citoesqueleto celular, o que pode acarretar a redução da superfície de contato destas células (REN et al., 2014a).

O zinco exerce um importante efeito modulador na homeostase neuronal quando em baixas concentrações, no entanto, acima de 6,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ produz efeitos tóxicos no organismo, tais como: alterações morfológicas das células, infra-regulação de proteínas como a GAP-43 – proteína de crescimento relacionada à germinação axonal e função neuronal –, parada do ciclo celular e indução à apoptose. Diante disto, os pesquisadores avaliaram a expressão da GAP-43 a fim de identificar alterações fenotípicas nas células PC12. Como esperado, à concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, nenhuma alteração foi verificada. Entretanto, a partir de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ percebeu-se uma drástica redução da expressão da GAP-43 sendo, a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, praticamente impossível de detectar a expressão da proteína (REN et al., 2014a). Diante de todos os fatos supracitados, os pesquisadores fazem a sugestão que o uso deste material não deva ultrapassar a concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e que esta é o bastante para promover o carreamento de fármacos.

O trabalho ainda demonstra que o uso de células PC12 é o melhor modelo de avaliação da citotoxicidade e neurotoxicidade de novos materiais. A linhagem é muito sensível à variação de funcionalidade das células em diversos aspectos e, portanto, vem sendo amplamente utilizadas em nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono, *quantum-dots*, óxido de ferro e nanopartículas de ouro (JEONG et al., 2011; REN et al., 2014a; ZHANG et al., 2011).

Por fim, fica notório que MOF's que contenham ferro e zinco como metais de transição são mais biocompatíveis que as demais pois apresentam baixa toxicidade e, portanto, são as prediletas quando se espera deste material um potencial terapêutico. Logo, são as MOF's que mais apresentam investigações relacionadas aos efeitos tóxicos no organismo.

2.3.1 Zeolitic Imidazolate Frameworks

O grande interesse científico nos materiais porosos se deve a 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

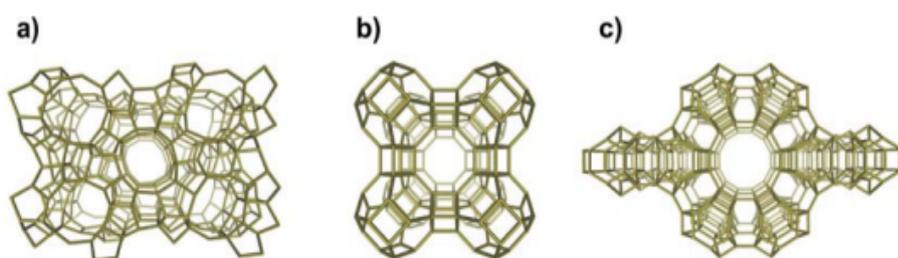
denominados materiais porosos inorgânicos, materiais à base de carbono e polímeros de coordenação (CUNHA, 2009).

Materiais porosos são classificados, segundo à 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 de 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 é possível 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 5). 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 5 – Três exemplos de redes zeólitas: a) Contendo um sistema de canais bidimensionais; b) Contendo cavidades; c) Contendo um sistema de canais unidimensionais.



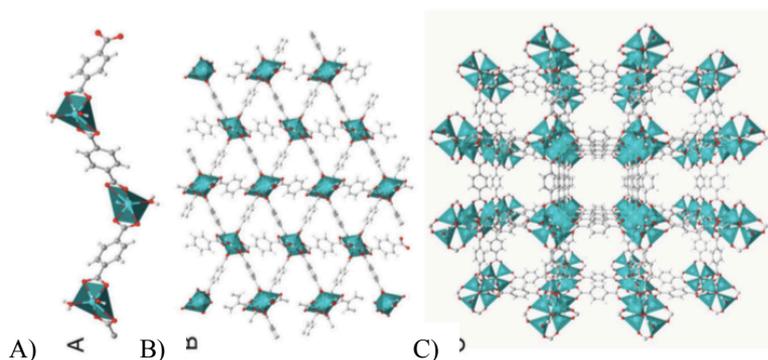
Fonte: CUNHA, 2009.

Estes materiais 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 as cavidades (geralmente <1,5 nm) que impõe limitações de tamanho e forma das moléculas hóspedes (CUNDY; COX, 2003).

Alguns esforços foram dedicados ao desenvolvimento de zeólitas com poros grandes ($>1,5$ nm), mas o sucesso foi modesto. 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).

O grande número de publicações acerca das *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIF) deve-se aos estudos pioneiros de Yagui e colaboradores (LI et al., 1998; O'KEEFFE et al., 2000; PARK et al., 2006; PHAN et al., 2010). As ZIF's são formadas por íons metálicos tetraédricos (como zinco, cobalto) conectados através dos *linkers* imidazolatos (IM). É justamente essa ligação (Metal-IM-Metal) que faz com que as ZIF's sejam semelhantes aos zeólitos comuns pois estes possuem uma ligação Si-O-Si, 145° , similar às ZIF's (PHAN et al., 2010). Entretanto, devido às vastas possibilidades de permuta entre diferentes metais e *linkers*, as ZIF's apresentam diferentes estruturas e tamanhos de poros devido a sua topologia denominada tipo sodalita (SOD). As ZIF's se apresentam como material lamelar classificado, quanto ao seu modelo de coordenação, em uma, duas ou três dimensões (Figura 6).

Figura 6 – Classificação das ZIF's quanto ao seu modelo de coordenação. A) Unidimensional. B) Bidimensional e C) Tridimensional.



FONTE: (RODRIGUES et al., 2012)

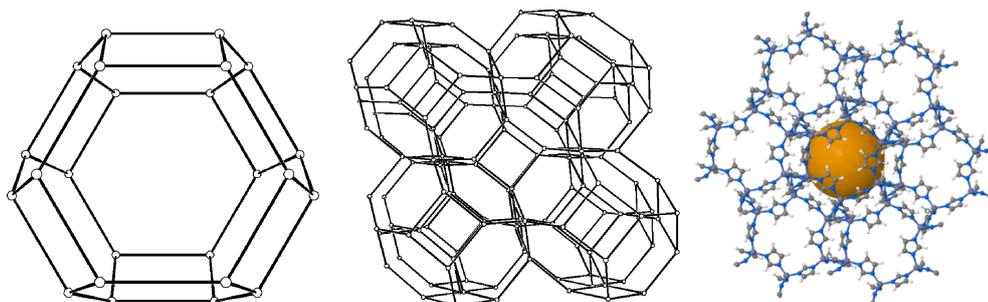
A síntese dessas moléculas é relativamente simples. Basicamente, consiste em combinar o sal do metal com o *linker* desejado, geralmente em DMF (N,N-dimetilformamida), aquecendo a solução à temperaturas entre $85-150$ °C. Atualmente, sínteses utilizando água como solvente e técnicas com apenas uma etapa vem sendo descritas (FAN et al., 2014; SCHEJN et al., 2014; XING et al., 2014). Tais condições são capazes de promover a desprotonação do *linker* para

posterior ligação ao metal. Com o resfriamento, é possível obter os cristais com bons rendimentos (geralmente entre 50-90%). Alguns fatores são críticos para a obtenção de cristais regulares em micro ou nanoescala, como: proporção molar metal:*linker*. Inclusive, a escolha do *linker* é a etapa limitante para a escolha da topografia a ser evidenciada pela ZIF formada. Sugere-se que o tipo de IM é essencial para a manutenção da ponte de ângulo de 145° e, portanto, para a manutenção da estrutura tridimensional (KIDA et al., 2013; PARK et al., 2006; PHAN et al., 2010; HU et al., 2016).

As ZIF's são uma subclasse das MOF's e, portanto, possuem características interessantes desta entidade química. Entre estas características: microporosidade, elevada área superficial e estabilidade cinética, além de apresentarem alta estabilidade térmica (FANG et al., 2015; PAPPARELLO; MIRÓ; ZAMARO, 2015). Entretanto, recentes inovações no campo de ciências de materiais fizeram as ZIF's possuírem ainda mais vantagens em relação às outras MOF's. Neste contexto, pode-se destaca-se a ZIF utilizada no presente trabalho: a ZIF-8 (figura 7). Esta estrutura é estabilizada devido as pontes realizadas entre o 2-metilimidazol (2-MIM) e o zinco tetraédrico. Como já foi visto, o zinco é o segundo metal mais abundante no organismo humano e o grupo imidazol é encontrado no aminoácido histidina o que, provavelmente, está relacionado com a boa biocompatibilidade da ZIF-8 (HU et al., 2016; KIDA et al., 2013; ZHUANG et al., 2014).

Diferente das MOF's convencionais, a ZIF-8 possui altas estabilidades química e térmica, mantendo-se íntegra até, pelo menos 400 °C. Ela pode, por exemplo, manter sua cristalinidade e tamanho de poros mesmo depois de fervida em água, em soluções alcalinas ou em solventes orgânicos sob refluxo (BANERJEE et al., 2009; LIÉDANA et al., 2012; PARK et al., 2006; PHAN et al., 2010; ZHANG et al., 2015).

Figura 7 – Representações tridimensionais da ZIF-8. a) Único poro com conformação em sodalita (esferas: átomo de zinco; traços: grupos 1,4-Benzenodicarboxilato); b) Rede de coordenação representando sodalita central circundada por outras oito; c) Representação tridimensional da ZIF-8



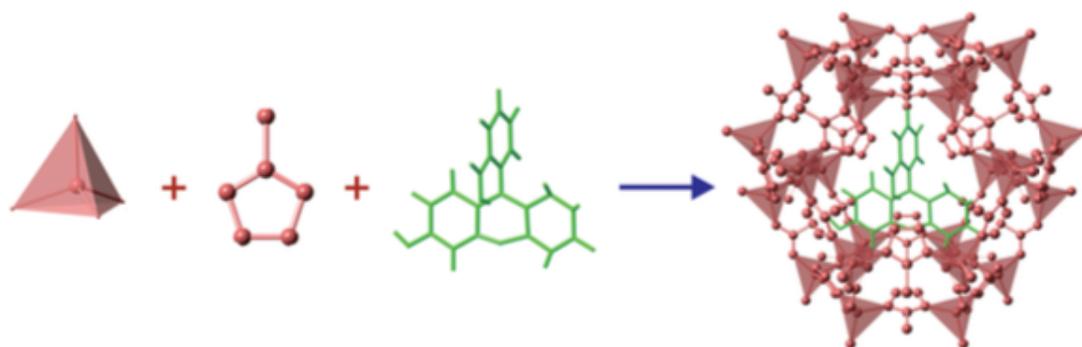
FONTE: Adaptado de HUANG; ZHANG; CHEN, 2003; PHAN et al., 2010; Liverpool Database, 2016).

A ZIF-8 utilizada no presente estudo possui forma unidimensional, no formato de lamelas (filamentos). Esta estrutura lamelar é mantida por meio de compensação entre interações π - π *stacking* e ligações de hidrogênio, resultando em uma cadeia polimérica de lamelas unidimensionais interconectadas (RODRIGUES et al., 2012). Diferente dos zeólitos convencionais, a ZIF-8 apresenta poros mais acessíveis, com cavidades médias de 11,6 Å. Entretanto, o acesso a esses poros é uma espécie de “janela”, espaços inter-reticulares, de tamanho médio 3,4 Å, o que pode dificultar a entrada de moléculas de grande porte (PHAN et al., 2010).

Em relação a sua estrutura cristalina, a ZIF-8 apresenta o átomo de zinco em uma rede de coordenação ligeiramente distorcida devido a ligação N-Zn-N com ângulo de 145°, aproximadamente. Assim, a rede de coordenação assume uma topologia característica das sodalitas, assumindo um padrão octaédrico central partilhado por faces tetragonais e hexagonais. A conformação central oferece um volume de, aproximadamente, 0,4 nm³ para o aporte de moléculas-hospedeiras. Esse volume, por exemplo, pode ser preenchido por dez moléculas de água. É justamente esse fato que incentiva a aplicação da ZIF-8 como um adjuvante farmacêutico (HUANG; ZHANG; CHEN, 2003; PHAN et al., 2010).

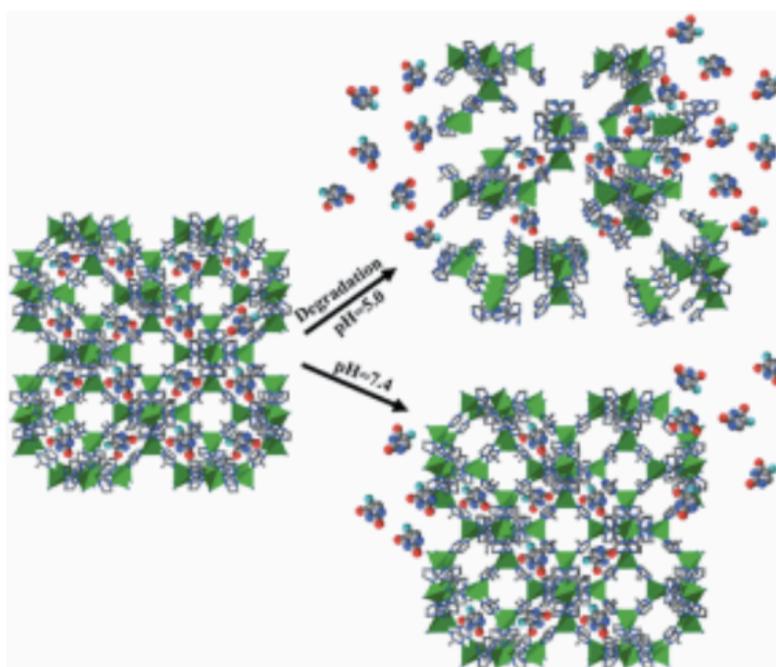
Dentre as características que fazem a ZIF-8 lamelar funcionar como excipiente inteligente de formulações farmacêuticas é a possibilidade da associação/intercalação de IFA's no espaço existente entre lamelas adjacentes ou por toda a extensão de uma mesma lamela (Figura 8), denominado cavidade ou espaço interlamelar, facilmente mensurado através do espaçamento basal. Além disto, as ZIF's apresentam boa biocompatibilidade e pode haver mudança nos componentes orgânico-inorgânico a fim de aumentar a interação fármaco-ZIF (EDGAR et al., 2001; HUXFORD; DELLA ROCCA; LIN, 2010; RODRIGUES et al., 2012).

Figura 8 – Encapsulamento de pequenas moléculas à rede da ZIF-8 evidenciando o zinco tetraédrico, o 2-metilimidazolato e uma pequena molécula de fármaco a ser complexada.



Outro ponto interessante é a coexistência entre áreas hidrofílicas e hidrofóbicas nos poros da ZIF-8, tal como ciclodextrinas. Este fator é decisivo para a adsorção de substâncias e posterior liberação. Além disto, MOF's em geral possuem fenômeno de *breathing* (respiração) gerando verdadeiros portões de saída para as substâncias adsorvidas. Isso ocorre devido à flexibilidade dessas moléculas, principalmente em meio ácido. A ZIF-8, por exemplo, apresenta dissociação da rede de coordenação na faixa de pH entre 5,0-6,0 o que pode promover a “respiração” da rede e liberação vetorizada do fármaco em ambientes que contenham esse pH (Figura 9) (ZHUANG et al., 2014; PAPPORELLO; MIRÓ; ZAMARO, 2015).

Figura 9 – Ilustração esquemática mostrando a liberação do 5-fluoracil em pH 5,0 (topo), devido dissociação da ZIF-8, e em pH 7,4 (abaixo). C = cinza, N = blue, O = vermelho, F = azul claro, Zn = verde.



FONTE: Sun et al., 2012

Devido muitas evidências teóricas sobre o sucesso da formação de DDS utilizando ZIF-8 como carreador, é possível citar trabalhos recentes que comprovam esta teoria.

2.3.1.1 Aplicações como *drug delivery systems*

A formação de sistemas carreadores de fármacos ou DDS se dá devido a interação entre o fármaco e o carreador. Essas interações controlam o aporte e a liberação do fármaco através das MOF's. São exemplos dessas ligações: Forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, ligações π - π *stacking*, ligações iônicas e até mesmo covalentes. Dentre estas, a ligação

eletrostática entre fármacos ionizados e a MOF também ionizada é de interesse particular, pois a liberação do fármaco pode ser modulada através de troca iônica. Uma série de exemplos de aplicação da ZIF-8 como carreador está descrita a seguir.

Após atestarem a propriedade da ZIF-8 em se manter íntegra em pH 7,6 e se dissociar em meio ácido, Sun e colaboradores (2012) incorporaram o fármaco antitumoral 5-fluoracil (5-FU) à rede de coordenação através do método de adsorção. Com uma eficiência de incorporação de 45,4%, o sistema apresentou, em pH 7,6, rápida liberação inicial de 50% do 5-FU incorporado, seguido de um platô de liberação lenta por durante uma semana. Já em pH 5,0, o sistema liberou mais de 45% do fármaco em menos de uma hora (em contraste com apenas 17% em pH 7,6 neste mesmo intervalo de tempo), atingindo um platô em 12 horas, com mais de 85% de 5-FU liberado.

Vasconcelos e colaboradores (2012) promoveram a incorporação do agente antitumoral cloridrato de doxorubicina (DOXO). Com eficiência de incorporação de 16,3%, o sistema apresentou liberação de ordem 0 do fármaco cujo, após 30 dias, apresentou liberação de apenas 66% do ativo.

Liédana e colaboradores (2012) inovaram ao promover o encapsulamento *in situ* da cafeína à rede da ZIF-8. Através de um método rápido, de uma única etapa, os pesquisadores obtiveram o sistema com eficiência de incorporação de $28,1 \pm 2,6\%$. O sistema CAF@ZIF-8 liberou toda a quantidade de cafeína em apenas 27 dias, com 78% sendo liberado apenas nos 8 primeiros dias. Este controle da liberação se deu devido às interações de van der Waals entre a cafeína e os grupos 2MIM da ZIF-8, além da ligação CH-O entre os grupos imidazóis e a ligação C=O das moléculas de cafeína.

Zhuang e colaboradores (2014) promoveram o encapsulamento de fluoresceína e camptotecina em ZIF-8 de escala nanométrica (70nm), ideal para captação celular. No trabalho os pesquisadores compararam dois métodos de formação de sistemas: a adsorção das substâncias durante (também chamado *in situ*) e após a síntese da ZIF-8. Vale salientar que a fluoresceína é maior que as janelas da ZIF-8 e que pode ser visualizada por fluorescência.

O estudo demonstrou boa eficiência de encapsulação para a fluoresceína (10%) e para a camptotecina (30%) semelhante a outros trabalhos com diferentes MOF's (DELLA ROCCA; LIU; LIN, 2011; HORCAJADA et al., 2010; IMAZ et al., 2010). Ainda foi avaliada a manutenção da morfologia da ZIF-8 e a liberação da fluoresceína em pH 7,4 e 6,0 (tempão-fosfato). Após um dia de imersão, não foram observadas mudanças na forma da ZIF-8, apresentando menos de 10% da fluoresceína liberada em pH 7,4. Já em pH 6,0, foi evidente a

dissociação da rede uma vez que, em menos de uma hora, mais de 50% da substância foi encontrada no sobrenadante (ZHUANG et al., 2014).

Zhuang e colaboradores (2014) ainda adicionaram nanopartículas de óxido de ferro à síntese das nanoesferas de ZIF-8:fluorosceína. O resultado foi a formação de um núcleo de nanopartículas de óxido de ferro envolto pelas nanoesferas de ZIF-8:fluorosceína onde foi possível observar que, quando aplicado um campo magnético, as nanoesferas fluorescente migraram, sugerindo uma possível vetorização destas para determinados tecidos.

Ren e colaboradores (2014b) inovaram ao sintetizar polímeros de coordenação em escala nanométrica, associando ácido poliacrílico à ZIF-8 (PAA@ZIF-8). Os pesquisadores incorporaram DOXO ao sistema e obtiveram alta eficiência de incorporação (~95%), provavelmente devido a interação eletrostática entre os grupos de ácido carboxílico negativamente carregados e DOXO carregada positivamente, além da ligação a coordenação entre Zn^{2+} -DOXO. Quanto à avaliação da liberação do sistema, em pH 7,6 a foi liberada apenas 35,6% de DOXO em 60 horas de experimento. Em contraste, o sistema apresentou liberação de 75,9% do fármaco neste mesmo intervalo de tempo quando em pH 5,0.

He e colaboradores (2014) desenvolveram um complexo entre a ZIF-8 e *nanodots* de carbono fluorescente (C-dots). Os pesquisadores sintetizaram nanopartículas encapsulando o fármaco antitumoral 5-FU (C-dots@ZIF-8:5-FU) e avaliaram a liberação fármaco em tampão-fosfato em diferentes pH's, 7,4 e 5,5. Em pH 7,4 eles verificaram a liberação controlada de cerca de 40% nos primeiros estágios seguida de um controle de liberação de baixas concentrações. Já em pH mais ácido, 92% do fármaco já é liberado em menos de 48 horas, em contraste com apenas 67% no mesmo intervalo de tempo em pH neutro.

2.3.1.2 Toxicidade da ZIF-8

Vasconcelos e colaboradores (2012) avaliaram a citotoxicidade comparativa entre a ZIF-8, a DOXO e o sistema DOXO:ZIF-8 através do método do corante 3- (4,5-dimetil-2-tiazolo)-2,5-difenil-2-tetrazólio (MTT). Os pesquisadores utilizaram concentrações entre 0,01 a 7,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a DOXO e 0,79 a 14,96 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o sistema; e as seguintes linhagens celulares: CNI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano), HL-60 (células de leucemia promielocíticas humanas) e HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano). A linhagem CNI-H292 demonstrou maior sensibilidade às menores concentrações testadas ($IC_{50}=0,01$ e $0,79\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a DOXO e para o sistema, respectivamente). Para a linhagem HL-60,

foram observados os valores de $IC_{50} = 0,03$ e $5,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a DOXO e para o sistema, respectivamente. Já para a HT-29, os valores foram de $7,9$ e $14,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A ZIF-8 não foi citotóxica nas concentrações testadas ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), corroborando os resultados reportados anteriormente no presente trabalho. O sistema DOXO:ZIF-8 apresentou menor toxicidade devido a lenta liberação do fármaco.

Os pesquisadores ainda avaliaram a captação celular dos materiais através de microscopia confocal. As células tratadas com o sistema apresentaram fluorescência mais forte do que as células tratadas com DOXO isolada, sugerindo que a ZIF-8 favorece a captação do fármaco. A ZIF-8 isolada apresentou pequenos pontos de fluorescência, enquanto as células-controle (sem tratamento) não apresentaram fluorescência. A linhagem HL-60 apresentou mudanças estruturais tempo- e dose-dependentes para ambos os tratamentos (DOXO e sistema), caracterizadas devido presença de bolhas e de corpos apoptóticos (VASCONCELOS et al., 2012).

Zhuang e colaboradores (2014) avaliaram a citotoxicidade da ZIF-8 em linhagens de células de câncer de mama MCF-7 através do método de corante MTT após incubação por 12 horas. Os pesquisadores definiram a concentração de $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como EC_{50} , semelhante ao encontrado para outros nanomateriais inorgânicos e classificados, pelos próprios, como toxicidade moderada. Ainda foi possível avaliar a captação celular das nanoesferas de ZIF-8 contendo fluoresceína, através de microscopia confocal por varredura à laser, sugerindo que as células promovem endocitose de materiais em nanoescala em maior número comparado à endocitose de materiais microparticulados.

Neste mesmo trabalho os pesquisadores analisaram a citotoxicidade da camptotecina encapsulada à ZIF-8, observando uma redução da EC_{50} para $22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o que sugere o sucesso na liberação do fármaco. Isolado, o fármaco apresenta atividade em apenas 48 horas. Logo, sugere-se que a ZIF-8 aumentou a captação celular do fármaco, visto que o complexo teve início da eficácia em apenas 24 horas de incubação. Eles corroboraram este fato a partir do aumento dos níveis de p53 quando comparado às células que não foram tratadas com o complexo, um indicativo de morte celular (ZHUANG et al., 2014).

Ren e colaboradores (2014b) avaliaram a citotoxicidade do sistema PAA@ZIF-8 associado ao fármaco antitumoral DOXO através do método MTT em células MCF-7 (células de câncer de mama humano). Não foi evidenciada toxicidade significativa para o sistema. Mesmo após 24 horas de incubação, usando concentrações altas, como $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a

viabilidade celular foi de 90,8%. O sistema ainda foi menos tóxico que a DOXO isolada, pois liberou o fármaco mais lentamente. Através de microscopia confocal os pesquisadores ainda avaliaram a maior captação celular por endocitose da DOXO proveniente do sistema PAA@ZIF-8 em 3 horas após administração, em comparação com a DOXO isolada. Em 12 horas foi possível observar a passagem pela membrana nuclear e consequente ação farmacológica sobre a morte nuclear, sendo mais pronunciado o efeito em 24 horas.

Mais tarde, He e colaboradores (2014) verificaram a segurança de nanopartículas de C-dots@ZIF-8 em células normais e outras linhagens celulares, tais como: HeLa, DU145 (câncer prostático), e L929 (fibroblastos); em diferentes concentrações através do método do corante MTT. Mais de 90% das células permaneceram viáveis após 24 horas de incubação nas concentrações entre 1,56 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando boa biocompatibilidade. Através de microscopia confocal foi possível observar o influxo dos materiais nas células HeLa, do contrário do que se pensava, que estes permaneciam aderidos à superfície celular. O trabalho ainda mostrou que o complexo C-dots@ZIF-8 mostrou-se mais seguro que o 5-FU isolado, uma vez que este último é liberado mais lentamente a partir do complexo.

A toxicidade da ZIF-8 ainda foi recentemente avaliada por Aguilera-Sigalat & Bradshaw (2016). Os pesquisadores avaliaram a citotoxicidade *in vitro* através do ensaio do corante MTT, utilizando células humanas de câncer cervical (HeLa), de próstata (DU145) e fibroblasto (L929). No trabalho, ZIF-8 encontrava-se complexada a nanopartículas de carbono fluorescente ou *quantum dots* (QD).

O trabalho evidenciou que as concentrações 1,56 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram boa biocompatibilidade, visto que mais de 90% das células se apresentaram viáveis após 24 horas. Em adição aos fatos, os pesquisadores, através de imagens de fluorescência, ainda verificaram a presença destes compósitos associados ao fármaco 5-fluoracil (5-FU) no citoplasma das células HeLa, provavelmente interiorizadas por endocitose, diferente do esperado que era a adsorção destes materiais à membrana citoplasmática. Outro fato interessante foi a avaliação da toxicidade comparativa entre o compósito associado ao 5-FU e o fármaco isolado, demonstrando que os efeitos citotóxicos foram menos impactantes quando o novo material foi avaliado. Sugere-se que isto se deu por conta da modulação da liberação do fármaco que se deu mais lenta (AGUILERA-SIGALAT; BRADSHAW, 2016).

Assim, fica evidente a concordância entre os resultados de Vasconcelos e colaboradores (2012), Ren e colaboradores (2014) e de Aguilera-Sigalat & Bradshaw (2016) no tocante da

biocompatibilidade dos materiais supracitados pois todos indicam a concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ como não citotóxica para as linhagens de células utilizadas. Os trabalhos ainda evidenciaram a redução dos efeitos tóxicos quando se compara os sistemas fármaco:MOF com os metais de transição ou com os fármacos isolados.

Diante destes fatos, considera-se seguro o uso da ZIF-8 – MOF selecionada para o desenvolvimento do trabalho –, nas células estudadas, respeitando o limite de concentração observado. Portanto, no presente trabalho, a ZIF-8 foi utilizada como excipiente inovador a fim de atuar como carreador de fármacos, modificando sua liberação, aumentando a taxa de dissolução do fármaco e promovendo a formação de um DDS.

2.4 Liberação controlada

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, semissólida ou líquida. As FF sólidas de uso oral (FFSO) são as mais usadas onde, após sua administração, o fármaco deve ser liberado e se dissolver nos fluidos gastrintestinais para que seja absorvido e exerça a ação farmacológica esperada (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006; AULTON, 2007).

As FFSO podem ser classificadas, de acordo com o tipo de liberação do fármaco, em produtos com liberação convencional ou modificada. As FFSO 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 insumos ativos, 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 a fim de modular a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução. Dentre os principais objetivos, destacam-se: tornar a FF gastrorresistente, prolongar o efeito farmacológico, liberar o fármaco em um sítio

específico do trato gastrointestinal (TGI) ou após um período definido de tempo (AULTON, 2007; 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 o mesmo conceito, existem sistemas carreadores, como lipossomas, niossomas, aquassomas, transferssomas, nanocápsulas, microcápsulas, ciclodextrinas, microesponjas, entre outros. (AULTON, 2007; HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

A liberação modificada de fármacos proporciona algumas vantagens sobre as formas de dosagem convencionais, devido ao fato de tais sistemas de fornecimento apresentarem uma maior segurança, eficácia, toxicidade reduzida no sentido de menor incidência de efeitos indesejáveis e o aumento da 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. Isto é particularmente interessante para fármacos de Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) classe II, como é o caso do BNZ utilizado no presente trabalho (ADIBKIA; ALAEI-BEIRAMI; BARZEGAR-JALALI, 2012; PETITTI; VANNI; BARRESI, 2008).

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, destacam-se os 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 matriciado em uma malha 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 (AULTON, 2007; ALVES, 2013; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

A ZIF-8 foi utilizada no presente trabalho é um exemplo de sistema polimérico. Sabendo disto, é possível controlar a taxa de dissolução do fármaco através de diferentes dispositivos. Alguns deles serão descritos a seguir:

1. Sistemas matriciais:

As matrizes são dispersões ou soluções de um fármaco em uma ou mais substâncias capazes de modular a sua liberação, geralmente são 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 quimicamente ligado 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 (AULTON, 2007; LOPES; LOBO; COSTA, 2005; STEINGRÄBER; SHTOLTZ; RODRIGUES, 2008; VILLANOVA, ORÉFICE, CUNHA, 2010).

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 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 (AULTON, 2007; LOPES; LOBO; COSTA, 2005; STEINGRÄBER; SHTOLTZ; RODRIGUES, 2008; VILLANOVA, ORÉFICE, CUNHA, 2010).

2. Sistemas reservatórios

Nestes sistemas, um reservatório (núcleo) contendo o fármaco é revestido por uma membrana polimérica. 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 realizada mediante difusão da substância ativa através do polímero e, assim, pode ser modulada pela seleção de um polímero no qual ela apresente a difusividade adequada (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). 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 (AULTON, 2007; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; VILLANOVA, ORÉFICE, CUNHA, 2010).

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 à *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 *push-pull* (AULTON, 2007; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; VILLANOVA, ORÉFICE, CUNHA, 2010).

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).

2.4.1 Mecanismo de liberação de fármacos

A liberação de fármacos a partir de uma matriz envolve determinados parâmetros. Entre eles, pode-se destacar: penetração de água na matriz polimérica, difusão do fármaco por entre os poros da rede, erosão do polímero e até mesmo uma associação entre estes processos. Portanto, a liberação dos fármacos ocorrem por intumescimento do polímero, difusão, erosão ou por mais de um destes processos (LYRA et al., 2007).

Em matrizes insolúveis ou inertes é comum que ocorra a penetração de líquido na matriz, seguido de dissolução do fármaco e conseqüente difusão pelos poros deixados pelo solvente. Neste caso, a matriz permanece inalterada ao longo de toda a dissolução, sendo eliminada quase que intacta. São exemplos desta matriz: etilcelulose, polietileno. Entretanto, nas matrizes insolúveis em água, a liberação do fármaco acontece devido difusão e erosão da matriz, sendo um mecanismo mais significante que o outro a depender das características físico-químicas do fármaco e polímero (LYRA et al., 2007; RECIFE, 2013).

Nas matrizes hidrofílicas é comum que ocorram todos esses processos. Inicialmente, o contato com a água faz com que o polímero faça a transição do seu estado vítreo, denominado *glassy*, para o estado maleável, também chamado *rubbery*. Isto ocorre devido ao processo de intumescimento ou relaxamento do polímero e é característico de alguns derivados da celulose,

tais como: metil- e hidroxipropilmetilcelulose. Nos fluidos gastrointestinais esse sistema intumescer, forma uma camada gel e, ao longo do tempo, pode se dissolver ou erodir (LYRA et al., 2007; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; RECIFE, 2013).

A difusão das substâncias a partir de um polímero é regida pela lei de Fick. Entretanto, quando o fármaco é matriciado ou quando a matriz entra em contato com o solvente, isto pode promover alguma alteração na estrutura do polímero e, portanto, desencadear um comportamento não-Fickiano ou anômalo. Desta forma, modelos matemáticos podem ser utilizados a fim de classificar a velocidade de difusão do solvente e de relaxamento do polímero, classificando estes mecanismos de transporte em: difusão Fickiana (caso I), difusão não-Fickiana (caso II, controlado pelo relaxamento da cadeia polimérica) e transporte anômalo, uma combinação dos dois primeiros (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; FERRAZ, 2013).

A difusão Fickiana (caso I) ocorre quando há um gradiente de concentração entre a matriz e o meio de dissolução, característica de uma difusão normal, tendendo a atingir um equilíbrio. Já o transporte não-Fickiano (caso II) ocorre quando há intumescimento ou relaxamento do polímero, que forma uma camada gel que impossibilita a entrada imediata de solvente no núcleo vítreo da matriz. A partir daí, os tipos de transporte subdividem-se em: transporte anômalo (uma junção, de mesma magnitude, dos dois mecanismos já vistos, difusão e relaxamento), transporte caso II (onde a velocidade de difusão do solvente é maior que a velocidade de relaxamento do polímero) e transporte super caso II (onde a velocidade de difusão do solvente é muito maior e, portanto, é o fator determinante do mecanismo de liberação) (ARORA et al., 2011; DASH et al., 2010; KHALID et al., 2014; RECIFE, 2013).

Em muitos casos, a difusão e a erosão podem ser fatores determinantes da liberação do fármaco. Nestas situações, há difusão do solvente para a matriz com consequente intumescimento, formação da camada gel e posterior erosão que finda quando toda a matriz polimérica é consumida, o que acaba por liberar o fármaco quase que completamente (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; RECIFE, 2013).

No presente trabalho, foi selecionado o método modelo-dependente para verificar a aplicabilidade de um modelo cinético de liberação e posterior definição do mecanismo de liberação. Entre os modelos, estão: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas Sahlin. O modelo de ordem zero baseia-se na liberação imediata, também chamada de efeito *burst*, causada pela liberação do fármaco aderido à superfície da matriz, seguido de

liberação lenta, especificamente em matrizes que não sofrem erosão. Nesses casos, verifica-se que a velocidade de difusão do fármaco é inferior à velocidade de dissolução, estabelecendo um equilíbrio entre o interior e o exterior da matriz, o que permite essa liberação lenta. Entretanto, a falta de ajuste faz com que o modelo seja considerado, em partes, obsoleto (LYRA et al., 2007; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

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 (LYRA et al., 2007).

O modelo de Higuchi tem como base a lei de Fick, esta dependendo da raiz quadrada do tempo. É utilizado para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial. Entretanto, o método leva em consideração o processo de intumescimento/relaxamento da cadeia polimérica. Logo, apresenta alguns problemas de ajuste, sendo mais indicado para matrizes unidimensionais pouco solúveis, que não apresentem capacidade de intumescimento, como por exemplo o acetato de celulose (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

O modelo de Korsmeyer-Peppas tem como base o modelo de Higuchi, mas leva em consideração outros mecanismos de liberação não-Fickianos, como os transportes anômalo, caso II e super caso II. Ele deve ser utilizado para descrever a liberação do fármaco através de um mecanismo duplo, que associa dois mecanismos de liberação: transportes casos I e II. Este deve ser utilizado para interpretar casos em que o mecanismo não é único e ocorre, tanto por transporte Fickiano, quanto por intumescimento/relaxamento e formação de uma camada gel, ou seja, a transição de um estado vítreo para o maleável (KHALID et al., 2014; LOPES; LOBO; COSTA, 2005; STEINGRÄBER; SHTOLTZ; RODRIGUES, 2008).

A determinação do tipo de transporte é feita mediante cálculo do expoente difusional ou coeficiente de liberação (n). A Tabela 1 mostra os valores de n agrupadas para cada geometria de forma farmacêutica utilizada no estudo de dissolução *in vitro*. No presente trabalho, foram utilizadas cápsulas de geometria cilíndrica.

Tabela 1 – Modelização dos mecanismos de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos de liberação controlada considerando as diferentes geometrias.

Coeficiente de liberação (n)			Mecanismo de liberação do fármaco
Filme	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
0,5<n<1,0	0,45<n<0,89	0,43<n<0,85	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso II
>1,0	<0,89	>0,85	Transporte super caso II

FONTE: Adaptado de LOPES; LOBO; COSTA, 2005; KHALID et al., 2014

O modelo de Peppas-Sahlin foi desenvolvido a fim de complementar as ideias trazidas por Korsmeyer (1983). Ele é utilizado para identificar a magnitude da influência da difusão e do relaxamento neste mecanismo de liberação que associa mais de um tipo de transporte. Isto é possível devido a inserção de dois termos (K1 e K2), referentes às constantes de liberação. Vale salientar que, diferente dos modelos de ordem zero e Higuchi – que são mutualmente exclusivos –, os modelos de Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin tendem a ser utilizados concomitantemente, a fim de corroborar os resultados obtidos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; DASH et al., 2010).

2.5 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: Difração de Raios-X (DRX), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de área superficial específica (método BET), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), estudos de cinética de

degradação, espectroscopia de absorção da região do Ultravioleta-Vis (UV-Vis), Microscopia de Luz Polarizada (MPL) e ensaios de dissolução *in vitro*.

2.5.1 Difração de Raios-X (DRX)

Entre as várias técnicas experimentais disponíveis para a identificação de formas sólidas, incluindo polimorfos, solvatos, sais, co-cristais e formas amorfas, a DRX se destaca no estudo destas formas farmacêuticas. DRX 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; SYKUŁA-ZAJĄC et al., 2011).

Macromoléculas e polímeros podem formar cristais da mesma forma que compostos inorgânicos e minerais. No princípio da DRX, 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 (MANSUR, 2007).

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 (MANSUR, 2007).

Através da equação de Bragg (Equação 1) é possível calcular o espaçamento basal. Estudos têm mostrado a utilização do espaçamento basal como um parâmetro determinante na

liberação sustentada de fármacos e no tratamento de água e outros materiais adsorvidos. O espaçamento basal (d) pode ser definido pelas equações 1 e 2 (XIONG et al., 2015):

$$2.d. \sin \theta = n.\lambda \quad (1)$$

onde: d - espaçamento basal; $\sin \theta$ - seno do ângulo *theta*; n - constante; e λ - comprimento de onda do cobre.

$$d_{\text{espaçamento}} = d_{\text{lamela}} + d_{\text{inter}} \quad (2)$$

onde d_{lamela} representa a estrutura do material e d_{inter} corresponde ao comprimento de espécies intercaladas e de absorção de água no espaço entre lamelas.

2.5.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

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 FTIR 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 fornece 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.

2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é utilizado em várias áreas do conhecimento, principalmente 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 ou mais 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 (MANSUR, 2007).

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 (MANSUR, 2007).

2.5.4 Método 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 (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).

2.5.5 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.

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).

2.5.6 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 (MANSUR, 2007).

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 (N_2 ou O_2), 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).

2.5.7 Espectroscopia de absorção na região do UV-Visível (UV-Vis)

O UV-Vis 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-Vis 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 (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

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 vs. padrão, amostra vs. equação da reta, amostra x extinção específica e titulação fotométrica (GIL et al., 2007).

2.5.8 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 óptico 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).

2.5.9 Estudo de dissolução *in vitro*

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, as etapas de desintegração, desagregação e dissolução da forma farmacêutica sólida nos fluidos gastrointestinais são imprescindíveis 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 são parte fundamental no desenvolvimento 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 semissólidas, 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 velocidade e extensão da liberação de fármacos a partir de comprimidos de liberação imediata/prolongada e cápsulas e, mais recentemente, de pós, comprimidos mastigáveis, sublinguais, as gomas de mascar, cápsulas de gelatina mole, supositórios, emplastos transdérmicos, aerossóis (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; PAAKKUNAINEN et al., 2009; QURESHI; MCGILVERAY, 1999; QURESHI; SHABNAM, 2003; QURESHI, 2004).

Para substâncias que facilmente atravessam a mucosa intestinal o aparecimento de níveis de dissolução vai ser controlada pelo tempo requerido para a forma farmacêutica liberar o seu conteúdo de fármaco e então, então, se dissolver. Em contrapartida, o crescente interesse na dissolução pode ser atribuída, principalmente, para substâncias que tendem a ser hidrofóbica, devido ao fato de que a etapa limitante da taxa no processo de absorção do fármaco a partir do trato gastrointestinal é frequentemente a dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica (JAMBHEKAR e BREEN, 2013).

Além da baixa solubilidade de fármacos, outras propriedades físico-químicas influenciam a biodisponibilidade oral destas substâncias, como a permeabilidade intestinal e o metabolismo pré-sistêmico. Vários modelos de dissolução dos fármacos mostram que a difusividade da droga, 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^{-1} , 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, a redução dos tamanhos de partículas de cerca de 3-5 μm é frequentemente 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 trato gastrointestinal (TGI) ao fármaco desempenha papel importante na manutenção das condições *sink*. O termo: condições *sink* é definido como sendo o volume do meio três a dez vezes superior ao necessário para criar uma solução saturada do fármaco (MARCOLONGO, 2003; BROWN et al., 2014). Na dissolução, essas condições são requeridas a fim de 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 *sink* são mantidas a fim de evitar a saturação do fármaco no meio de dissolução, melhorando a velocidade de dissolução das partículas de fármaco. Contudo, tal situação de saturação não ocorre tão frequentemente *in vivo*, devido à proximidade dos tecidos e/ou à rápida absorção para a corrente sanguínea (BROWN et al., 2004; KLOSE; DELPLACE; SIEPMANN, 2011). Baseado nesta premissa, Sun e colaboradores (2012) sugerem a utilização das condições *non-sink* a fim de analisar etapas da dissolução de fármacos, como: a supersaturação do meio e saturação e recristalização do analito em questão. Para obtenção das condições *non-sink*, os autores sugerem o uso do *System index* (SI), definido pela equação 3:

$$SI = \frac{C_s \cdot V}{\text{dose}} \quad (3)$$

Onde C_s é a solubilidade do fármaco em água, V é o volume do meio de dissolução e a dose corresponde a quantidade de fármaco na amostra utilizada no ensaio. Conforme Sun e colaboradores (2012), para obter uma condição *sink* o valor de SI deve ser entre 3 a 10.

Quando um fármaco hidrofóbico não é bem molhado pela água, isto é, quando o ângulo de contato é elevado, a superfície do TGI pode facilitar a molhagem de uma substância por fluido luminal, aumentando assim a capacidade do fluido gastrointestinal penetrar entre as

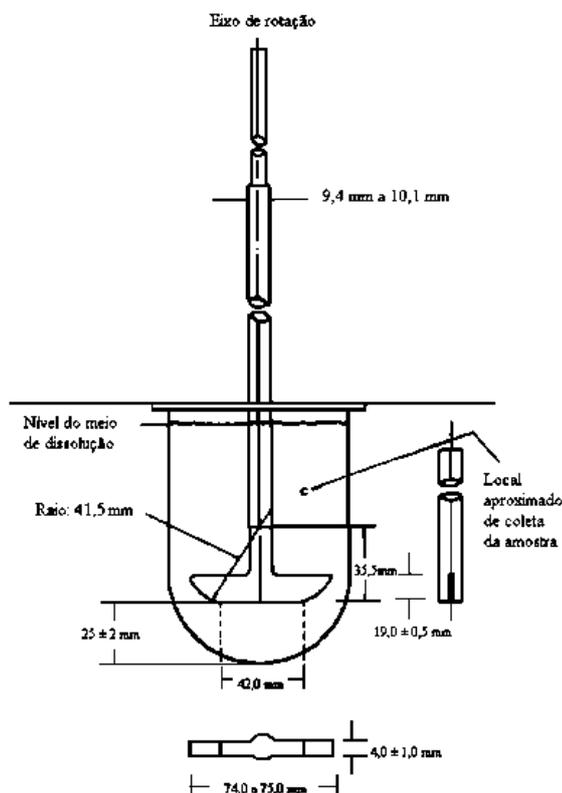
partículas do pó e os poros. Além disso, as condições do lúmen do TGI variam largamente quer intra- quer inter-individualmente. Variabilidade interindividual é devida a variações genéticas normais nas populações bem como de estados de doença. A variabilidade intra-individual pode ser resultado do ritmo circadiano, ingestão de alimentos, nível de atividade física e nível de estresse, entre outros (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

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 termostaticado, que permite manter a temperatura do líquido de dissolução a 37 °C ($\pm 0,5$ °C) durante todo o ensaio (MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2010).

São estabelecidas também algumas recomendações, como: utilização de meio aquoso, meios de dissolução típicos listados na farmacopeia americana (USP), a exemplos de ácido clorídrico diluído e tampões na gama de pH fisiológico. Os valores de pH recomendados variam entre as diversas farmacopeias, 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. A temperatura deve estabelecer-se a $37 \pm 0,5$ °C), as velocidades de rotação são variadas, podendo ser usualmente entre 50 e 100 rpm (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; BRASIL, 2010).

Figura 10 – Modelo de agitador de dissolutor no modelo de pás (aparato 2)



Fonte: BRASIL, 2010.

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. Neste tocante, o fármaco é considerado "pouco solúvel", quando a sua VID é mais lenta que o tempo que leva para atravessar seus sítios de absorção, acarretando uma biodisponibilidade incompleta (MARCOLONGO, 2003; JAMBHEKAR e BREEN, 2013).

As formas farmacêuticas sólidas orais de liberação modificada são aquelas em que a formulação propicia uma modificação na taxa ou no 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 aceitos 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).

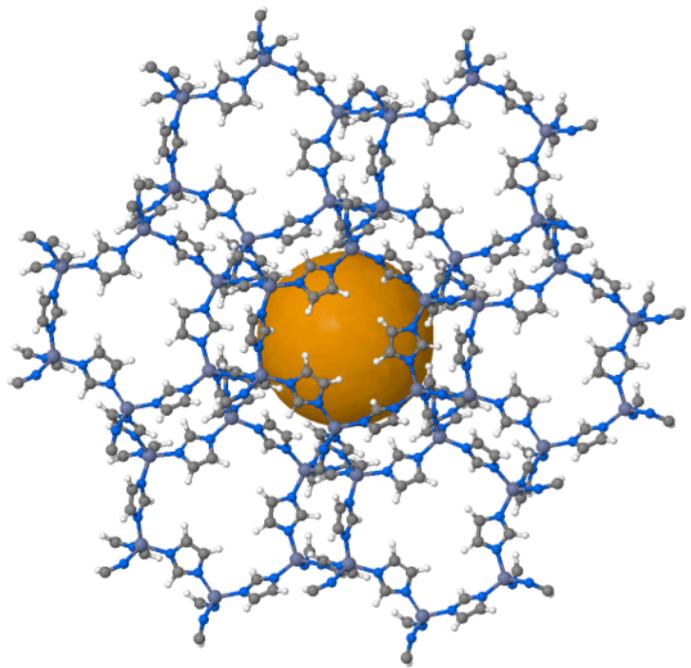
Portanto, a dissolução *in vitro* tem sido reconhecida como um elemento importante no desenvolvimento de medicamentos. O desenvolvimento de novas formulações com perfis de liberação modificada justifica a necessidade de definir especificações e critérios de aceitação alternativos, com o objetivo de se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

2.5.10 Avaliação da viabilidade celular através do método MTT

Técnicas laboratoriais podem ser utilizadas a fim de avaliar a viabilidade através do dano à membrana celular de diferentes linhagens que podem ser testadas. Talvez o mais trivial seja o método por brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O método é capaz de mensurar a função mitocondrial da célula e avaliar o nível de funcionalidade e não

somente a estrutura da célula. O referido ensaio pode ser utilizados para medir os resultados da proliferação de células, determinação de células viáveis e verificar efeitos citotóxicos de compostos (STODDART, 2011; BOCHNIE; GREGÓRIO & MACIEL, 2016).

O ensaio de MTT baseia-se na comprovação da citotoxicidade induzida por uma substância sob metabolismo celular mitocondrial, através da avaliação da atividade de de enzimas como a mitocondrial redutase e do seu respectivo potencial redox. A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água), pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, a formazan (um sal de coloração roxa e insolúvel em água) (MOSMANN, 1983; BOCHNIE; GREGÓRIO & MACIEL, 2016).



OBJETIVOS

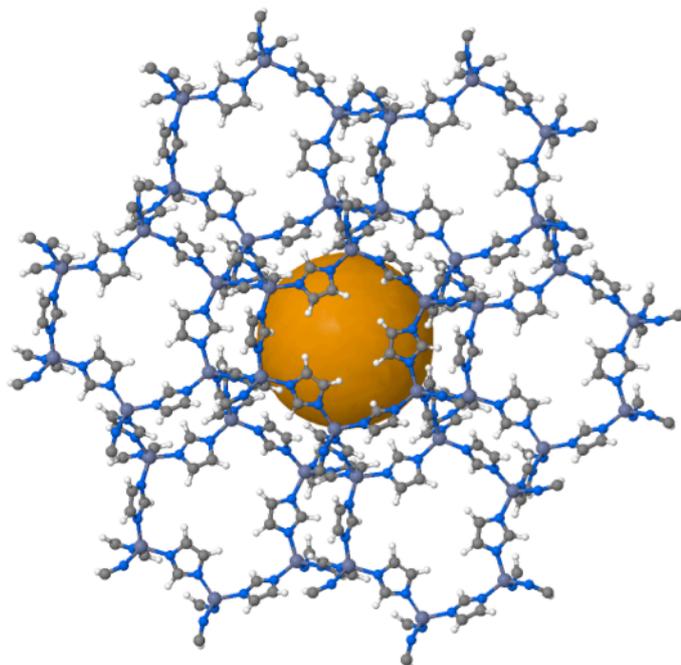
3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter e avaliar liberação *in vitro* de *Drug Delivery System* pH-dependente à base de benznidazol e ZIF-8 como etapa inicial de um estudo de pré-formulação de formas farmacêuticas destinadas ao tratamento alternativo da doença de Chagas.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver método de obtenção e otimização dos sistemas BNZ:ZIF-8 obtidos em diferentes solventes;
- ✓ Caracterizar sistemas obtidos através de diferentes técnicas analíticas, tais como: FTIR, DRX, MEV, MLP, DSC, TG, UV-Vis, análise de tamanho de partícula e de volume de poros; a fim de corroborar a formação do sistema;
- ✓ Avaliar a modulação da liberação do BNZ a partir da rede da ZIF-8 em diferentes pH's através de ensaios de liberação *in vitro*;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade do sistema desenvolvido através de método MTT.



MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

A relação de material e métodos utilizados durante o curso do trabalho foi descrita a seguir.

4.1 Material

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

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

4.2 Obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8

O método de obtenção utilizado no presente trabalho teve como base os trabalhos de Horcajada e colaboradores (2010), que promovem a incorporação/adsorção do fármaco depois da ZIF-8 já pronta. Este método é denominado *ex situ*. O procedimento utilizado para a produção de sistemas em diferentes proporções molares de BNZ:ZIF-8 (1:3, 1:1, 3:1 e 6:1), teve como base os pesos moleculares do BNZ e da ZIF-8 – 260,25 e 229,61 g.mol⁻¹, respectivamente.

Inicialmente o fármaco foi solubilizado em solvente adequado: água ultra-pura (Mili-Q[®]) ou acetona, em *erlenmeyers* com capacidade para 250 mL, obtendo concentrações iniciais de 15 e 20 µg.mL⁻¹, respectivamente. Os solventes foram determinados devido à relativa solubilidade do fármaco. Em contraste com os métodos de quantificação do BNZ que utilizam metanol como solvente orgânico, a escolha da acetona baseou-se na menor toxicidade inerente ao solvente orgânico, menor custo e consequente maior transposição para a escala industrial, além da alta volatilidade em baixas temperaturas.

A solução de BNZ foi sonicada por 10 minutos em sonicador Limp Sonic[®], a fim de garantir a completa solubilização do mesmo. Em seguida, a ZIF-8 foi suspensa no mesmo solvente e adicionada à solução de BNZ. Em seguida, completou-se o volume com respectivo solvente, submetendo a mistura à agitação intermitente em Agitador Magnético MA089 Marconi[®] com auxílio de barra magnética por até sete dias. Diariamente, o sobrenadante foi coletado (0,33 mL, seguido de reposição do solvente) e filtrado em filtro de seringa (hidrofóbico

ou hidrofílico, com 0,22 μm de abertura de poro) para posterior quantificação em espectroscopia por absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) – 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 do BNZ à rede da ZIF-8.

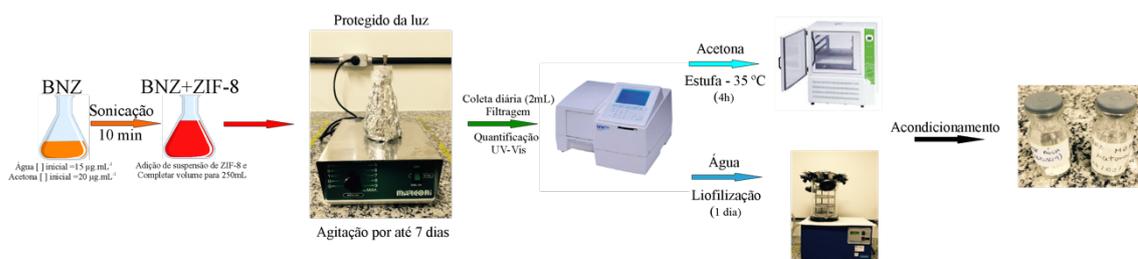
A utilização de dois diferentes solventes visou a otimização da máxima eficiência de incorporação (EI%) de fármaco nos sistemas, calculada através da equação 4.

$$\%EI = \frac{[\text{BNZ}_{\text{teórica}}][\text{BNZ}_{\text{real}}]}{[\text{BNZ}_{\text{teórica}}]} \times 100 \quad (4)$$

A acetona foi utilizada a fim de otimizar o método no que tange a redução da quantidade de moléculas de água incorporadas à ZIF-8 (quando a água é utilizada como solvente); e de reduzir do custo do processo no que tange o uso de solvente orgânico e o gasto de energia elétrica devido ao longo tempo de agitação.

Ao final do processo o sistema foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos a fim de retirar a quantidade residual de BNZ. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com respectivo solvente de obtenção. O mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida, procedeu-se a secagem do material através de liofilização (Liofilizador L101 LioTop[®]) ou de estufa de secagem com fluxo de ar a 35 °C (Shel Lab[®]) até completa secagem (em torno de 1 dia para liofilização e de 4 horas para secagem em estufa), para os sistemas obtidos com água e acetona, respectivamente. A estufa foi o método de secagem escolhido para a acetona pois outros métodos, como a rotaevaporação, reduziram a quantidade de resíduo coletado uma vez que o material fica aderido ao balão de fundo redondo. Uma vez seco, o material foi utilizado para quantificação da EI% do fármaco à rede da ZIF-8. A figura 11 sumariza o processo de produção dos sistemas BNZ:ZIF-8.

Figura 11 – Fluxograma geral para obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8



FONTE: Autoria Própria (Imagens do Google Imagens)

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

No caso da obtenção em acetona, as vidrarias foram vedadas, a fim de reduzir a volatilização do solvente. Contudo, o conteúdo volatilizado foi constantemente reposto após verificação de perda de massa, tomando como base o valor de $0,79 \text{ g.mL}^{-1}$ para a densidade da acetona.

4.3 Caracterização dos materiais

As técnicas descritas a seguir foram elencadas para avaliar as propriedades físico-químicas dos materiais obtidos a fim de corroborar a formação dos sistemas. Para fins comparativos foram obtidas Misturas Físicas (MF) na proporção molar 1:1 (mol/mol) mediante simples agitação (5 minutos) em frascos de penicilina.

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

Para a obtenção da varredura de 190 a 1000 nm por espectrofotometria na região UV utilizou-se espectrofotômetro ultravioleta da marca SHIMADZU® UV-2401 PC e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm.

4.3.2 Difração de Raios-X (DRX)

A análise de DRX foi realizada em difratômetro XRD-7000 da SHIMADZU®, equipado com ânodo de cobre a uma velocidade de varredura de $1,2^\circ.\text{min}^{-1}$, na faixa do ângulo 2θ de 5° - 45° . O cálculo do espaçamento basal foi realizado através da equação de Bragg (equação 1). Para o preparo das soluções/suspensões, foram utilizados os solventes do item 4.1.

4.3.3 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 em equipamento BAL-TEC® modelo SCD 050. 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 300 e 750 vezes.

4.3.4 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

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 laminula de vidro com 1 mm de espessura. Já como meio anisotrópico difuso de fundo foi utilizado uma lamina polida de quartzo hialino, gerado através de um corte subparalelo a seção basal do cristal e apresentando uma espessura de 1,1 cm.

4.3.5 Análise térmica

Dentre as técnicas de análise térmica foram realizadas a Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As curvas TG foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu[®], modelo TGA Q60, 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 para os sistemas obtidos em água e em acetona; acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 1000 °C na razão de aquecimento (β) de 10 °C.min⁻¹. Antes dos ensaios, a termobalança foi verificada com oxalato de zinco.

As curvas DSC do BNZ e das MF foram obtidas utilizando Calorímetro Shimadzu[®] DSC-60 interligado ao software Shimadzu[®] TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, na faixa de temperatura de 25-500 °C. As amostras foram colocadas em porta-amostra de alumina hermeticamente fechada com massa de 3 mg ($\pm 0,2$) para BNZ e ZIF-8 e 6 mg ($\pm 0,2$) das 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.

4.3.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho do BNZ, MF e associações foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer[®] (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 a 600 cm^{-1} .

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

As amostras foram dispersas em uma 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 da 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 tamanho e volume 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 degaificadas por 48 horas a 110 °C para remoção de qualquer material adsorvido na superfície do material. As análises foram decorridas na temperatura de atomização 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, dando origem às isotermas de adsorção/dessorção aplicando modelos adequados para o ajuste dos pontos experimentais. Foi feita a aplicação do modelo BET na porção adequada da curva desde que o valor da área superficial (BET e Langmuir).

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 *in vitro*, a ser descrito no item 4.3.9.

Excesso de BNZ (aproximadamente 200 mg) foi previamente pesado 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 25 °C. Aliquotas 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.

4.3.9 Ensaio de dissolução *in vitro* nas condições *sink*

Os ensaios de dissolução foram realizados a fim de definir as associações que melhor apresentasse perfil de liberação modificada. Diferentes meios de dissolução foram utilizados para mensurar a dissolução do sistema em diferentes pH's. Os ensaios foram feitos sob temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, utilizando 500 mL de tampões fosfato (pH 4,5 e 7,6) como meios de dissolução, aparato 2 (pá) e velocidade de rotação 75 rpm, utilizando dissolutor Varian[®] VK 7010. Os meios de dissolução foram escolhidos com base em estudos recentes que mostram a modulação da liberação pH-dependente do fármaco a partir da rede da ZIF-8 (LIÉDANA et al., 2012; VASCONSELOS et al., 2012; HE et al., 2014). Um pH mais ácido não foi utilizado devido a rápida dissociação estrutural da ZIF-8, o que resultaria em uma liberação extremamente rápida do fármaco (PARK et al., 2006).

Foram pesadas em balança Shimadzu[®] do modelo AUX 220 quantidades equivalentes a 36,66 mg de BNZ onde, se completamente dissolvida em um volume de 500 mL, apresentaria uma concentração igual a $73,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estabelecendo, desta forma, a condição *sink*. Em intervalos de tempo predefinidos (cinética inicial de 0,083, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 horas, seguida de uma coleta exploratória até que houvesse uma liberação do fármaco de até 80%), 5 mL das amostras foram coletadas, filtradas em filtro de membrana 0,20 μm e, posteriormente diluídas para a quantificação do teor de BNZ por espectroscopia no UV-Vis mini a 323 nm (Modelo 1240, Shimadzu[®]), utilizando a metodologia previamente validada (DA SILVA et al., 2007). 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) e percentagem de fármaco dissolvido por tempo de coleta. Os cálculos de AUC foram realizados com auxílio do *software* Origin[®] 8 da Origin Lab Solutions e Microsoft Excel[®] 2007 e estes resultados foram comparados com base na análise estatística realizada através dos *softwares* Excel[®] e PAST[®] 3.14, mediante aplicação de ANOVA *one-way* e Teste de Tukey, respectivamente.

Em relação ao tratamento de dados, estes foram corrigidos quanto à perda de volume e de fármaco durante as coletas, de acordo com cálculo similar ao encontrado na literatura (ARONSON, 1993; SINGH; KAUR; SINGH, 1997). A equação 5 representa a correção da concentração (C_{corr}) em teste de dissolução em que há reposição.

$$C_{corr} = C_n + \frac{V_S}{V_t} \sum_{i=1}^{n-1} C_i \quad (5)$$

onde 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 .

Visando analisar se houve ou não a modulação da liberação do fármaco, foi realizada a comparação entre os perfis de liberação através dos métodos: modelo-dependentes e modelo-independente. Para método modelo-dependente foi analisado o ajuste aos modelos de: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin. A equação de regressão da reta foi determinada para linhas de tendência dos gráficos correspondentes, seguindo as fórmulas gerais apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Modelos matemáticos de estudo cinético 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.

A escolha do modelo matemático mais pertinente foi realizada a partir do coeficiente de determinação (r^2) e do coeficiente de determinação ajustado ($r^2_{ajustado}$), o último é calculado através da equação 6 e, quanto mais próximo de 1 o valor numérico de $R^2_{ajustado}$, melhor a amostra se ajusta ao modelo (ZHANG et al., 2010).

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times (1 - r^2) \quad (6)$$

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.

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

Para o método modelo-independente foi utilizado o fator de semelhança (f_2), também chamado de fator de similaridade. O f_2 é uma transformação logarítmica recíproca à raiz quadrada da soma do erro quadrático e é uma medida de semelhança da porcentagem de dissolução entre duas curvas. O f_2 pode ser obtido através da equação 7 (DASH et al., 2010; BRASIL, 2010).

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \sqrt{\left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]} \times 100 \right\} \quad (7)$$

onde: n é número de tempos de coleta considerados para fins de cálculo; Rt é valor de porcentagem dissolvida no tempo t , obtido com a curva de referência ou comparador e Tt é valor de porcentagem dissolvida da curva teste ou da formulação alterada, no tempo t .

4.3.10 Ensaio de dissolução *in vitro* nas condições *non-sink*

Os ensaios de dissolução *in vitro* em condições *non-sink* foram realizados utilizando os mesmos equipamentos e tratamentos de dados descritos no item 4.3.9. Entretanto, para a manutenção da condição *non-sink* foi utilizado uma menor quantidade equivalente de fármaco e de meio.

No estudo, amostras de 27,5 mg de BNZ foram utilizadas onde, se completamente dissolvida em um volume de 250 mL, apresentaria uma concentração igual a 110 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, estabelecendo, desta forma, a condição *non-sink*. Para a MF e para o sistema foram utilizadas amostras na proporção molar 1:1 em relação ao fármaco. Esta concentração foi estabelecida com referência ao ensaio de solubilidade quantitativa (descrito no item 4.3.8) e ao SI (equação 3) que, no presente ensaio, teve valor igual a 2, caracterizando a condição *non-sink*.

4.3.11 Ensaio de liberação *in vitro* – Diálise sob condições *sink*

O ensaio da liberação *in vitro* do BNZ ainda foi realizado através do método de diálise. Amostras de 18,33 mg de BNZ foram utilizadas nos estudos de diálise, onde, se completamente dissolvida em um volume de 250 mL, apresentaria uma concentração igual a $73,32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, estabelecendo, desta forma, a condição *sink*. Como o sistema apresentou perfil de liberação mais eficiente nos ensaios de dissolução, a MF não foi utilizada. Para o sistema foram utilizadas amostras na proporção molar 1:1 em relação ao fármaco.

No experimento 2 (dois) mL da formulação do sistema BNZ@ZIF-8 e o mesmo volume de fármaco isolado foram colocados em sacos de diálise (10.000-12.000 Da) (Sartorius®, Alemanha). As membranas de diálise foram imersas em 250 mL de meio de liberação constituído de tampão-fosfato, pH 4,5 e 7,6, a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação contínua de 75 RPM. Alíquotas (2 mL) do meio externo foram coletadas nos intervalos de tempo de 0,083, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, seguido de uma coleta exploratória até que houvesse uma liberação do fármaco de, pelo menos, 80%. O meio de liberação foi repostado a cada coleta a fim de manter as condições *sink*. A quantidade de BNZ liberada foi avaliada através de UV-Vis.

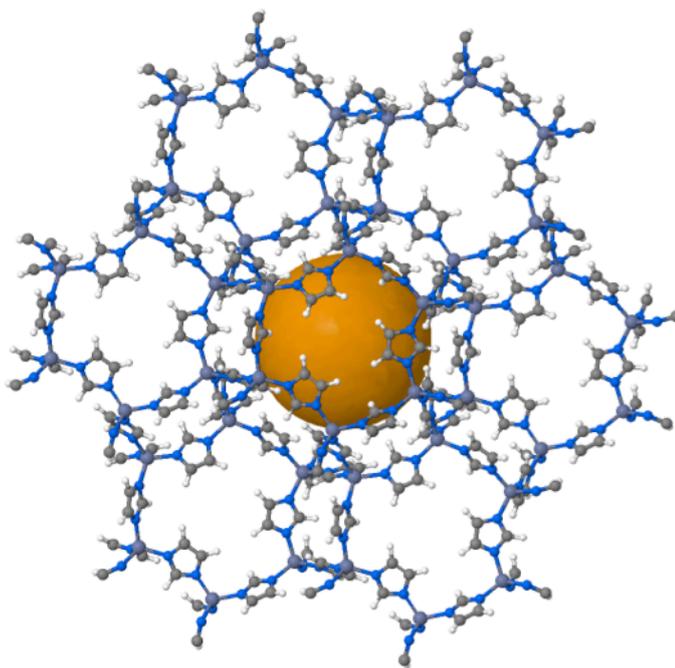
4.3.12 Avaliação da viabilidade celular e da citotoxicidade *in vitro* através do método MTT

Para o ensaio de citotoxicidade celular *in vitro* foi utilizado o sangue total (5 mL) de voluntários saudáveis e não-tabagistas, obtido por punção venosa após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos doadores (número de referência do Comitê de Ética Nacional: 30667014.5.0000.5208). As células mononucleares do sangue periférico (do inglês: *peripheral blood mononuclear cells*) (PBMC) foram obtidas a partir do sangue total através do método Ficoll-quantum (Ficoll-Paque™ PLUS) (POHLA, 2007; ITN, 2008). As células humanas PBMC foram semeadas a uma densidade de $5 \cdot 10^6$ células/poço, em uma placa de 96 poços contendo meio de cultura *Dulbecco MEM* (DMEM) suplementado com tampão-fosfato a 10%.

As culturas foram estimuladas com BNZ e ZIF-8 em 3 diferentes condições: i) ZIF-8 a uma concentração de $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ii) BNZ nas concentrações de 1, 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e iii) Sistema BNZ:ZIF-8 1:1 (mol/mol) obtido em acetona nas mesmas condições do fármaco isolado. Este sistema foi o único utilizado pois apresentou melhores perfis de eficiência de

incorporação e de dissolução. As células foram incubadas durante 24 e 48 horas, a 37 °C, em atmosfera umidificada de CO₂ a 5%. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de DMEM fresco juntamente com 10 µL de solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg.mL⁻¹ em tampão-fosfato) por poço, prosseguindo com a incubação, no escuro, durante 4 horas a 37 °C na mesma atmosfera mencionada anteriormente. Como controle negativo foi utilizado: células não-tratadas, MTT e tampão-fosfato. Já para o controle positivo, utilizou-se o meio sem células, MTT e tampão-fosfato. Para o branco, foram utilizadas células mortas (Triton-X 0,1-1%), MTT e tampão-fosfato. Finalmente, foi registrada a absorbância (a 570 nm) através de leitor de microplacas ELISA.

Em relação ao tratamento estatístico dos resultados, cada ensaio foi realizado em duplicatas biológicas e triplicatas técnicas, e os resultados foram apresentados como médias ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism[®] versão 5.0 considerando como significante valores com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram, então, comparados por análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparação múltipla de Dunn e do teste *t* de *Student*. A concentração necessária para a inibição de 50% (IC50) foi estimada graficamente através de análise de regressão linear e os índices de correlação foram calculados utilizando o coeficiente de Pearson (*r*).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir foram descritos os resultados e discussão acerca dos dados obtidos para o desenvolvimento de *Drug Delivery Systems* pH-dependentes à base de BNZ e ZIF-8.

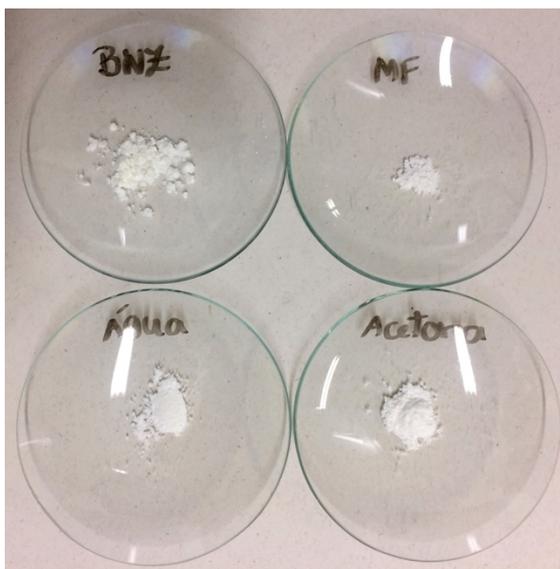
5.1 Desenvolvimento do método de obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8

Para a obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8 em meio aquoso e em acetona objetivou-se caracterizá-los a fim de confirmar a incorporação e/ou adsorção superficial do fármaco à rede de coordenação da ZIF-8.

5.1.1 Aspecto Macroscópico

O BNZ é um pó cristalino, levemente amarelado. Já a ZIF-8 tem coloração branca. Nos sistemas obtidos foi observada a coloração branca, mais características da ZIF-8 (Figura 12). Em relação às características reológicas do pó, os sistemas apresentam características bem diferentes das amostras isoladas e da MF, principalmente com base na reduzida higroscopicidade, característica relevante do BNZ.

Figura 12 – Aspecto macroscópico dos materiais: BNZ, MF e sistemas obtidos em água e acetona.



FONTE: A autoria própria

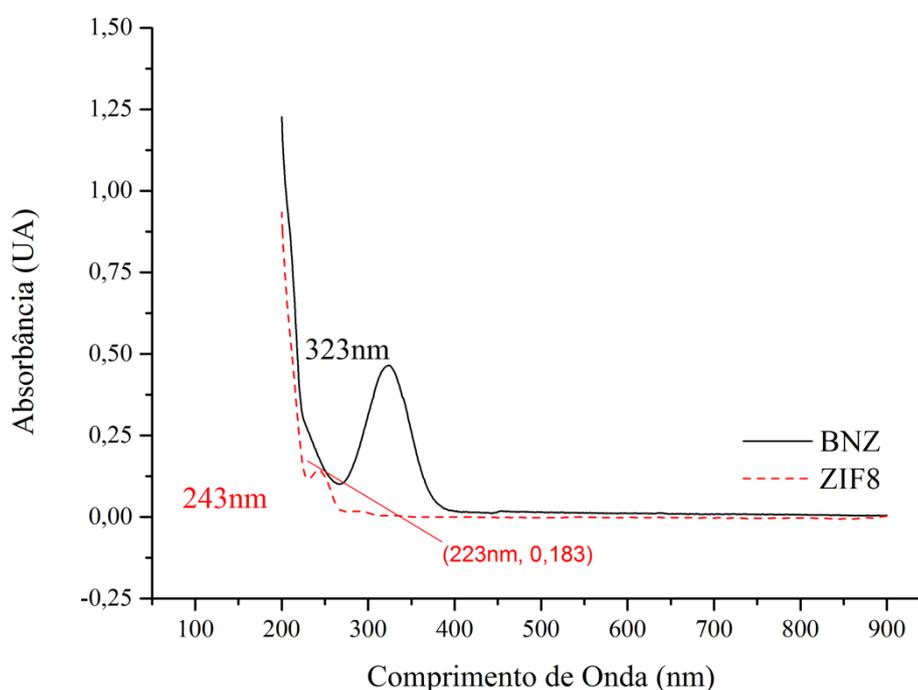
5.1.2 Avaliação da incorporação do fármaco nos sistemas BNZ:ZIF-8

Através da espectroscopia por absorção na região do UV-Vis foi possível determinar o comprimento de onda de leitura ser utilizado para a quantificação da incorporação do BNZ. Com base na varredura (200-1000 nm) (Figura 13), a solução aquosa de BNZ ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) teve máxima absorção em 323 nm, enquanto a ZIF-8, em 243 nm.

A fim de provar que a ZIF-8 não seria um contaminante capaz de interferir na seletividade do método de quantificação do BNZ, uma quantidade de 10 mg de ZIF-8 foi suspensa em 100 mL de água ultra-pura, seguido de filtração (poro do filtro: $0,22 \mu\text{m}$) e quantificação através de UV-Vis.

Embora a ZIF-8 também apresente pico de absorção na região do UV-Vis, o método não apresentou problemas de seletividade pois o material 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 da amostra no momento que a amostra é filtrada, como evidenciado por Alves (2013).

Figura 13 – Varredura do espectro de absorção na região do UV-Vis do BNZ e da ZIF-8

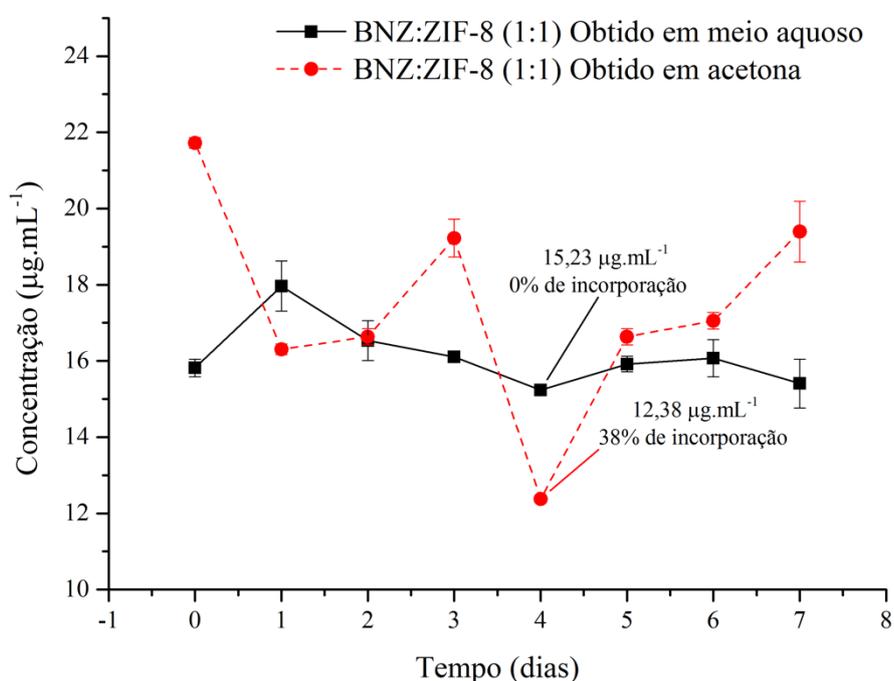


FONTE: Autoria própria

Assim, foi possível construir curvas de calibração diárias, tomando como base o método desenvolvido por Soares-Sobrinho e colaboradores (2007), possibilitando o cálculo da

incorporação aparente do BNZ à rede da ZIF-8. O experimento visou o decaimento da concentração do fármaco, justificada pela sua incorporação à 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, conforme descrito pela equação 4 de EI%. As curvas de incorporação estão demonstradas na Figura 14 (ZHUANG et al., 2014).

Figura 14 – Curvas de incorporação do BNZ à rede da ZIF-8 em água (preto, linha contínua) e em acetona (vermelho, linha tracejada).



FONTE: Autoria própria

A partir das curvas de incorporação foi possível observar que, passados quatro dias de agitação, o valor de EI% do BNZ à ZIF-8 foi 0 (zero) para o sistema em meio aquoso. Sugere-se que este valor tenha sido obtido devido a baixa afinidade do BNZ pelo solvente, impossibilitando a sua entrada na ZIF-8, já que a água deveria atuar como o veículo carreador. Em contrapartida, o sistema obtido em acetona apresentou menor ponto de concentração no dia 4, totalizando, aproximadamente, 38% de incorporação. Resultados de eficiência de incorporação semelhantes foram evidenciados por Zhuang e colaboradores (2014). Os valores das concentrações inicial e final estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 – Concentração inicial e concentração analisada no momento da coleta (dia 4) e respectivos desvios-padrão.

Sistema	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Obtido em meio aquoso	15,00	15,23 \pm 0,29
Obtido em meio acetona	20,00	12,83 \pm 0,98

FONTE: Aatoria própria.

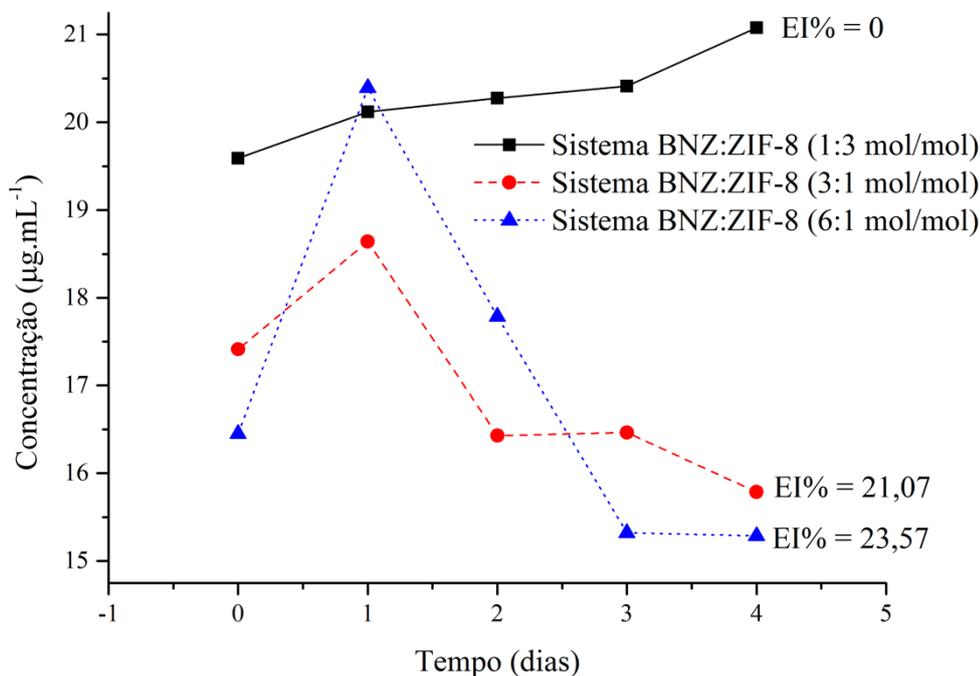
Entretanto, este valor pode compreender não somente ao fármaco complexado à cavidade da ZIF-8, mas também apenas adsorvido à superfície da mesma. Desta forma, visando corroborar o resultado obtido, foi realizada a redispersão do sistema em respectivo solvente – a fim de solubilizar o BNZ residual – seguido de centrifugação a 2000 rpm por 20 min. O objetivo deste passo foi identificar o valor real de incorporação do fármaco à rede da ZIF-8, visto que se acredita que todo o BNZ apenas adsorvido fisicamente à superfície da ZIF-8 seja liberado devido a intensa força centrífuga aplicada. De fato, foi possível comprovar que, mesmo após 20 minutos de centrifugação, o valor de eficiência de incorporação foi de 34%.

Os experimentos – realizados em triplicata – demonstraram baixo desvio padrão dos pontos isolados (tabela 3), evidenciando a confiabilidade dos resultados. Em adição a este fato, tanto o sistema obtido em acetona demonstrou a melhor condição de agitação em 4 dias. Dessa forma, foi padronizada a obtenção do 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 através de FTIR, DRX e MEV, a fim de corroborar a reprodutibilidade dos resultados, obtendo sistemas com as mesmas propriedades físico-químicas, garantindo assim a produção continuada dos materiais.

Visando otimizar ainda mais o método de obtenção dos sistemas utilizando acetona, foram avaliadas diferentes proporções molares (1:3, 3:1 e 6:1 mol/mol) a fim de identificar a proporção que apresentasse maior eficiência de incorporação. Contudo, os valores de EI% foram todos abaixo do apresentado pela proporção molar de 1:1 (0; 21,07 e 23,57, respectivamente), conforme observado na Figura 15.

Figura 15 – Curvas de incorporação e valor de eficiência de incorporação (EI%) dos sistemas BNZ:ZIF-8 nas proporções molares 1:3; 3:1 e 6:1 mol/mol.



FONTE: Autoria própria.

Desta forma, o sistema obtido em acetona na proporção molar 1:1 foi o selecionado para dar continuidade ao trabalho, uma vez que apresentou maior EI% que as demais proporções. Este sistema foi, então, denominado BNZ@ZIF-8. Tal sistema foi o objetivo de estudo das técnicas de caracterização. Em alguns casos, o sistema obtido em água BNZ:ZIF-8 1:1 (mol/mol) com EI%=0% e a MF foram utilizados para fins comparativos.

5.1.3 Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

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, foram observados, em 3132, 2962 e 2936 cm^{-1} , a presença de 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} foi 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} (PARK et al., 2006).. 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 realizadas em equipamentos que operavam até 600 cm^{-1} .

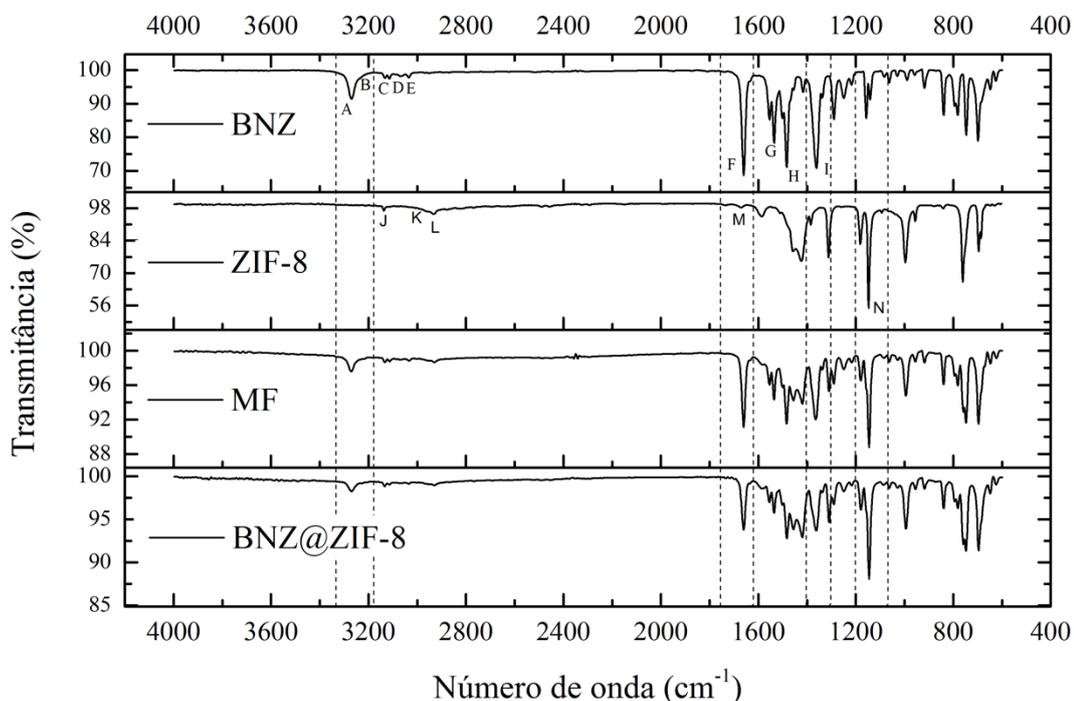
O espectro da MF (Figura 16) corresponde a sobreposição das mesmas bandas do BNZ e da ZIF-8 quando estes são analisados em isolado, onde é possível notar a presença dos picos característicos dos mesmos. Este resultado sugere uma interação apenas física entre o fármaco e a ZIF-8, devido ao somatório dos perfis dos materiais isolados.

Analisando o sistema BNZ@ZIF-8 (Figura 16), os picos do BNZ e da ZIF-8 isolados não são bem evidenciados, devido a sobreposição dos mesmos. Entretanto, foi possível sugerir a presença do fármaco em questão, em virtude da presença, em 3266 cm^{-1} e em 1292 cm^{-1} , da 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 redução da intensidade dos picos também foi observada. Adicionalmente, houve diminuição da intensidade da banda de absorção referente ao grupamento C-N da ZIF-8 (1400 e 1302 cm^{-1}), isto pode indicar algum tipo de interação com BNZ que deve ser melhor evidenciada através de estudos complementares (VASCONCELOS et al., 2012).

Assim, ao comparar os espectros de infravermelho do sistema, da MF e das substâncias isoladas, observou-se que o sistema apresentou os principais picos em menor intensidade,

indicando, desta forma, a formação do sistema devido os indícios de interação entre o BNZ e a ZIF-8 (VASCONCELOS et al., 2012; GOMES et al, 2015).

Figura 16 – Espectros de infravermelho do BNZ, da ZIF-8, da MF e do sistema BNZ:ZIF-8 (1:1) obtido em acetona (os espectrogramas estão na mesma escala).



FONTE: Autoria própria.

5.1.4 Análise Térmica (DSC, TG/DTG)

O uso da análise termogravimétrica foi indispensável na elucidação da degradação do BNZ frente à temperatura e na corroboração da formação do sistema. A comparação dos resultados de TG e DSC, obtidos em condições semelhantes, pode ser de grande valia para a interpretação dos processos térmicos. As curvas TG obtidas para todos os materiais citados até então estão demonstradas na figura 17.

A curva TG do BNZ 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 observada em apenas um único evento (257,15-297,13 °C) ($DTG_{pico}=287,43$ °C). Foi verificada uma perda de massa de 45,66%.

Na curva TG do ZIF-8, a porção orgânica 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 105 °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 perda de apenas 7% da massa inicial, o que evidencia a alta estabilidade térmica da ZIF-8, este valor também pode indicar a saída de moléculas de água ligadas coordenadamente à rede da ZIF-8. No intervalo de 535,69-578,16 °C foi possível observar uma perda de massa significativa – melhor evidenciada pela curva DTG – de 24,32%, relativa 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 (FANG et al., 2015; LIU et al., 2011; ORDOÑEZ et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2012).

Na curva TG da MF BNZ:ZIF-8 1:1 (mol:mol) 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 certa proteção térmica no que tange a redução da 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 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 isolado, 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, isso sugere que há pouca ou nenhuma interação entre o BNZ e o carreador. 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 (FANG et al., 2015; LIÉDANA et al., 2012; PARK et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2012).

Na análise do sistema BNZ@ZIF-8, 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 da rede da ZIF-8, uma vez que o decaimento pode ser observado desde a temperatura ambiente, tendo a acetona baixos pressão de vapor e ponto de ebulição. Este valor, ainda menor que o encontrado para a ZIF-8 isolado, 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 também observada uma antecipação da degradação térmica do fármaco em relação ao BNZ isolado (223,39-245,34 °C) (FANG et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2012).

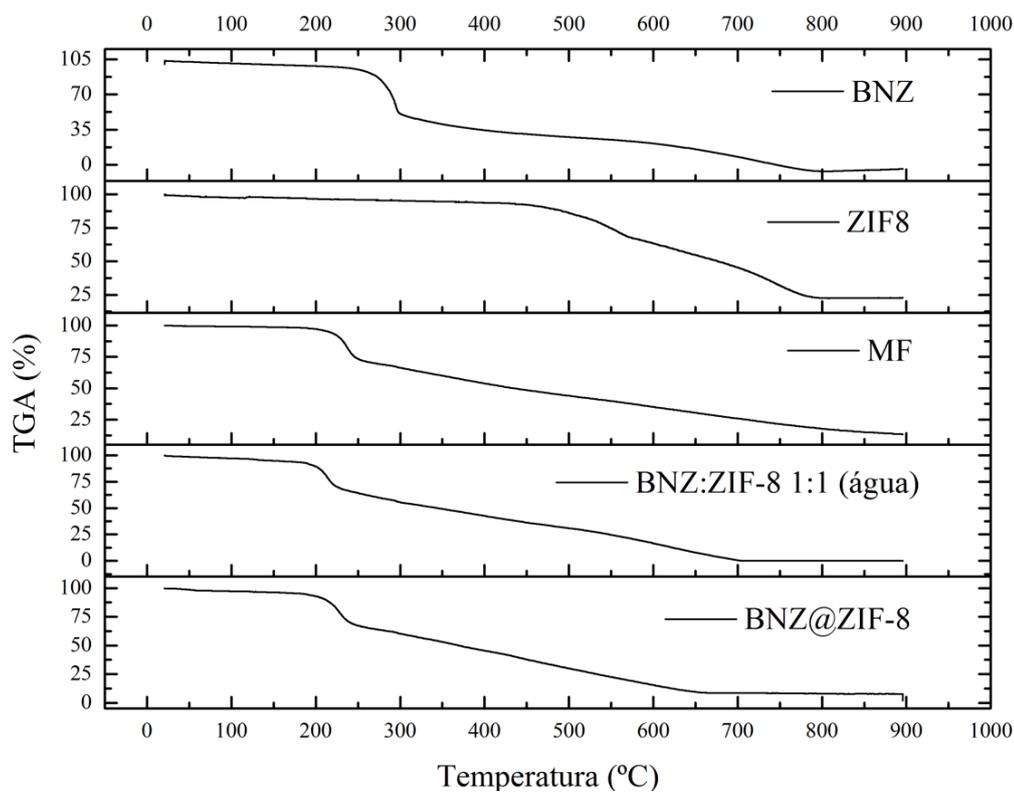
Entretanto, houve uma redução ainda mais significativa da perda de massa (26,49%). A degradação da porção inorgânica da ZIF-8 ocorreu no intervalo entre 321,02-434,88 °C, com uma perda de massa de 16,15%; seguida da decomposição térmica até óxido de zinco (568,51-613,31 °C e 32,78% de perda de massa). Apesar de ter sido evidenciado que os valores de degradação da ZIF-8 foram antecipados, ambos mostraram uma redução significativa do teor decomposto. Entretanto, novas investigações acerca deste fato devem ser feitas a fim de analisar o que promoveu este comportamento anômalo. Os resultados supracitados estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados comparativos do perfil térmico obtido através das curvas TG dos materiais: BNZ, ZIF-8, mistura física e sistema.

Material	Perda de água		Degradação do BNZ		Degradação ZIF-8	
	Faixa de Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Faixa de Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Faixa de Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
BNZ	30-105	1,62	257,15-297,13	45,66	-	-
ZIF-8	30-105	2,16	-	-	535,69-578,16 620,35-720,11	24,32 41,91
MF	30-105	1,62	229,89-247,23	24,49	410-89-448,54 620,32-975,07	11,55 36,78
BNZ:ZIF-8 (Água)	30-105	4,17	214,65-234,64	27,15	392,28-438,55 623,42-754,21	24,23 32,68
BNZ@ZIF-8	30-105	1,97	223,39-245,34	26,49%	321,02-434,88 568,51-613,31	16,15 32,78

FONTE: Autoria própria

Figura 17 – Curvas TG do BNZ, da ZIF, da MF e dos sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1) obtidos em solução aquosa e em acetona ($\beta=10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).



FONTE: Autoria própria.

A curva DSC do BNZ (Figura 18) apresentou pico endotérmico referente à fusão do fármaco bastante intenso e definido, na faixa de temperatura entre $190,04\text{--}194,36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{pico}}=191,44\text{ }^{\circ}\text{C}$) ($\Delta H=195,52\text{ mJ}$). Em seguida, foi observado o pico exotérmico relacionado à degradação do fármaco no intervalo entre $272,57\text{--}292,79\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{pico}}=286,90\text{ }^{\circ}\text{C}$), o qual apresentou grande despreendimento de energia ($\Delta H=1,8\text{ J}$). Resultados semelhantes foram descritos por Santos e colaboradores (2015).

A curva DSC da ZIF-8 (Figura 18) demonstra a ausência de picos na faixa de temperatura utilizada, característica inerente a natureza da molécula. Por se tratar de uma molécula híbrida orgânica-inorgânica, os eventos de degradação da ZIF-8 foram analisados através da curva DTA (Apêndice A), que possibilitou o aquecimento da amostra até $900\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nesta, foi possível observar dois eventos endotérmicos referentes à transição de fase: o primeiro entre $535,69\text{--}578,16\text{ }^{\circ}\text{C}$; e o segundo, entre $620,35\text{--}720,11\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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. Resultados semelhantes foram discutidos por Blachnik & Siethoff (1996). Tais 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 das cadeias alquílicas (BLACHNIK; SIETHOFF, 1996).

A partir da curva DSC da MF BNZ:ZIF-8 1:1 (Figura 18) foi possível evidenciar a antecipação do evento de fusão do fármaco (187,82-194,28 °C). Embora este fato pode 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-excipiente, mesmo sem ocasionar a formação propriamente dita do sistema. 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 ($\Delta H=1.090$ mJ). Estes valores estão em consonância aos evidenciados pela curva DTA.

A curva DSC do sistema BNZ:ZIF-8 1:1 (Figura 18) obtido em meio aquoso demonstrou 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 ($\Delta H=2.140$ J).

Na curva DSC do sistema BNZ@ZIF-8 (Figura 18), 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 obtido com água, pode caracterizar a formação do sistema. Na fusão do fármaco componente do sistema foi observado uma discreta antecipação (184,44-192,91 °C) ($T_{pico}=189,97$ °C). Esta variação – de aproximadamente 2 °C – é descrita por muitos autores como uma faixa aceitável da compatibilidade entre componentes de uma mesma formulação (COSTA et al., 2013; DE MELO et al., 2014). Logo, este comportamento pode identificar que o sistema obtido em acetona é, de fato, mais eficiente no que tange a incorporação do fármaco. Os resultados supracitados estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados comparativos do perfil térmico obtido através das curvas DSC dos materiais: BNZ, ZIF-8, mistura física e sistema.

Material	Fusão do BNZ		Degradação do BNZ	
	Faixa de Temperatura (°C)	ΔH (mJ)	Faixa de Temperatura (°C)	ΔH (mJ)
BNZ	190,04-194,36	195,52	272,57-292,79	1.800,00
ZIF-8	-	-	-	-
MF	187,82-194,28	195,52	221,89-247,23	1.090,00
BNZ:ZIF-8 (Água)	178,52-188,76	472,73	212,57-231,28	2.140,00
BNZ@ZIF-8	184,44-192,91	261,25	216,72-244,86	1.800,00

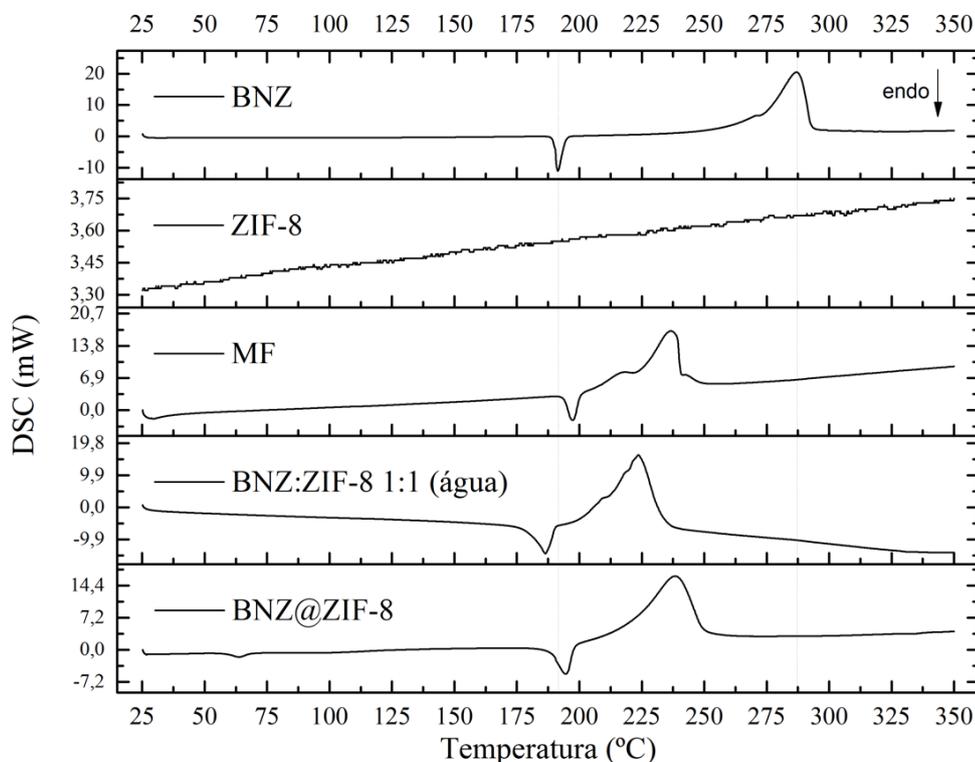
Fonte: Autoria própria

O deslocamento do máximo pico de temperatura de fusão para temperaturas inferiores e o alargamento do pico de fusão pode indicar a redução no tamanho dos cristalitos e, conseqüentemente, uma melhor solvatação dos mesmos pelo solvente. Neste caso, esperava-se um menor valor de entalpia para o processo. No entanto, o valor para a variação de entalpia foi maior em comparação ao fármaco isolado ($\Delta H = 261,25$ mJ). Isto pode ocorrer devido a tendência da distribuição heterogênea do tamanho dos cristalitos, que se recristalizam sob a superfície da ZIF-8 (JANIGOVA; LACÍK & CHODÁK, 2002). No entanto, este novo perfil térmico é mais um indicativo de que o sistema foi formado.

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 1.800 J, semelhante ao apresentado pelo fármaco isolado. A antecipação da degradação do fármaco e o alargamento deste pico (visto na MF e nos sistemas) pode ser atribuído a uma interação química entre a molécula do BNZ e a ZIF-8, devendo esta ser considerada em futuros estudos.

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

Figura 18 – Curvas DSC do BNZ, da ZIF, da MF e dos sistemas BNZ:ZIF-8 (1:1) obtidos em solução aquosa e em acetona ($\beta=10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (as linhas mais claras correspondem ao evento de fusão e de degradação térmica do fármaco isolado).



FONTE: Autoria própria.

5.1.5 Difração de Raios-X (DRX)

O perfil difratométrico do BNZ confirmou a natureza cristalina da amostra. Foi possível evidenciar numerosos picos de difração de alta intensidade, sendo os mais característicos: $7,36^{\circ}$; $16,28^{\circ}$ e $21,86^{\circ}$ (2θ), além da presença de picos secundários. Estes dados estão em conformidade com estudos recentes do grupo (SOARES-SOBRINHO et al., 2012; SANTOS et al., 2015)

O DRX da ZIF-8 também determinou a característica altamente cristalina da molécula, devido a presença de picos bastante intensos ($7,44^{\circ}$) e outros de média intensidade ($10,46^{\circ}$ e $12,78^{\circ}$). Os picos $7,44^{\circ}$; $10,46^{\circ}$ e $12,78^{\circ}$, referentes a um cubo de corpo-centrado, correspondem às reflexões 011, 002 e 112 (Park, et al., 2006). 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 em consonância com trabalhos recentes (PAPPARELLO; MIRÓ; ZAMARO, 2015; PARK et al., 2006)

A MF entre BNZ e ZIF-8 na proporção 1:1 (p/p) evidenciou um somatório dos perfis de ambos os componentes isolados, apresentando alguns dos seus picos característicos. Entretanto,

o comportamento cristalino do ZIF-8 demonstrou-se mais evidente devido ao intenso pico em $7,44^\circ$, seguido de outros, relevantes no BNZ, porém apresentando-se com menor intensidade em relação ao fármaco isolado ($16,76$ e $21,84^\circ$).

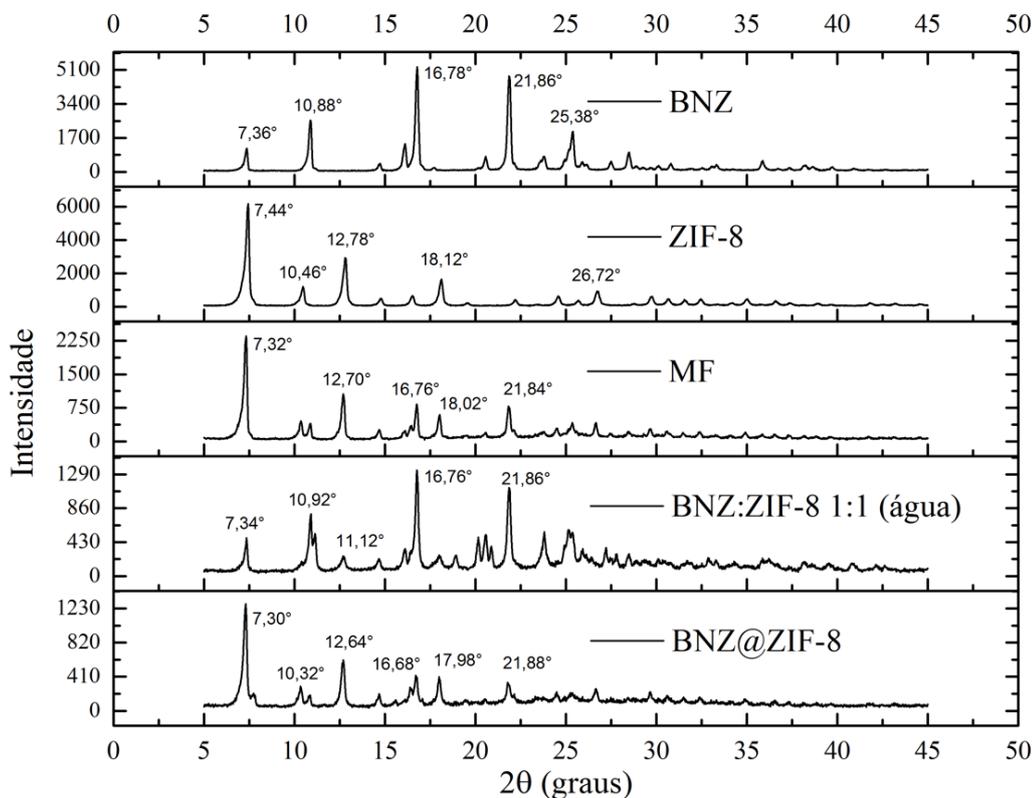
O sistema BNZ:ZIF-8 na proporção de 1:1 (mol/mol) obtido em solvente aquoso apresentou perfil muito semelhante ao da MF. Entretanto, os picos característicos do BNZ são bem mais intensos que os da ZIF-8. Isto sugere que boa parte do BNZ está livre ou levemente adsorvido à ZIF-8, o que confirma a nulidade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

O sistema BNZ@ZIF-8 também apresentou comportamento cristalino, resultando em somatório dos perfis difratométricos das substâncias isoladas. Porém, diferente da MF, o sistema apresentou os picos mais característicos do BNZ ($7,36$; $10,88$; $16,82$ e $21,88^\circ$), embora com menor intensidade, em comparação com os perfis de DRX isolado. Apesar de não se demonstrar amorfo, o DRX é diferente do visto para a MF, o que sugere a formação do sistema, mesmo que este seja apenas caracterizado pela adsorção física do BNZ à superfície da ZIF-8.

Neste material foi observada a redução da intensidade do pico característico da ZIF-8 ($7,44^\circ$) indica a atração entre o BNZ e a rede da ZIF-8. Resultados semelhantes foram evidenciados por Liédana e colaboradores (2012). Outro fato importante deve ser levado em consideração: a redução da intensidade dos picos característicos do fármaco, comparada à MF sugere uma redução da quantidade de BNZ livre, evidenciando que boa parte do fármaco está molecularmente disperso na rede de coordenação da ZIF-8. Liédana e colaboradores (2012) também utilizaram desta técnica para afirmar tal consideração,

É importante destacar que os DRX obtidos demonstram que a integridade estrutural de ZIF-8 permanece inalterada depois da adsorção do BNZ. Isto é de suma importância pois evidencia que, mesmo que a formação dos sistemas promova certa redução dos picos da molécula, a integridade estrutural cristalina da ZIF-8 é mantida (VASCONSELOS *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015). Os resultados do DRX de todos os materiais estão sumarizados na figura 19.

Figura 19 – DRX do BNZ, da ZIF-8, MF e dos sistemas obtidos em água e em acetona.



FONTE: Autoria própria.

Por se tratar de um material lamelar, o cálculo do espaçamento basal pode ser uma ótima ferramenta para comprovar a formação dos sistemas. O espaço entre as lamelas pode mudar com o aporte do fármaco, ora de forma física, ora com presença de cargas elétricas e está intimamente ligado à liberação sustentada de fármacos, tratamento de água e outras matérias adsorvidas (XIONG et al., 2015). O espaçamento basal (d) pode ser definido pela equação de Bragg (Equação 1).

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 o espaço entre as lamelas. Entretanto, foi verificado o discreto aumento do tamanho do espaçamento basal quando se compara a ZIF-8 isolada à MF e aos sistemas obtidos (Tabela 6), principalmente no pico de reflexão 110, o qual caracteriza a estrutura cristalina da ZIF-8 e o formato dodecaédrico rômbo de seus cristais (HE et al., 2014). O fato corrobora a formação do sistema, mas sugere que este é produto de uma adsorção do fármaco à 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 6 – Cálculo do espaçamento basal dos picos de reflexão 110, 002 e 112 da ZIF-8, Mistura Física e Sistemas obtidos em água e em acetona.

Amostra	Pico ($^{\circ}2\theta$)	Reflexão	Espaçamento Basal (Å)
ZIF-8	7,44	110	11,87
	10,46	002	8,71
	12,78	112	6,94
MF BNZ:ZIF-8 1:1 (mol/mol)	7,32	110	12,04
	10,4	002	8,51
	12,70	112	6,97
BNZ:ZIF-8 1:1 (mol/mol) – Água	7,34	110	12,16
	10,92	002	8,11
	11,12	112	7,99
BNZ@ZIF-8	7,3	110	12,11
	10,32	002	8,10
	12,7	112	6,97

FONTE: Autoria própria.

5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV do fármaco demonstrou o aspecto cristalino regular do BNZ (Figura 20.a-b) corroborando com o resultado do DRX do fármaco. A maior parte dos cristais apresenta tamanhos irregulares de, aproximadamente, 100 μm . Os resultados estão em consonância com trabalhos prévios do grupo (SOARES-SOBRINHO et al., 2012).

A ZIF-8, também cristalina, demonstrou um aspecto rômboico dodecaédrico uniforme (quase esférico) (Figura 20.c-d), bastante diminuto, acompanhada de agrupamentos de nanocristais de, aproximadamente, 100 nm – estando em consonância com outras nanoZIF-8 estudadas (FANG et al., 2015; HU et al., 2016).

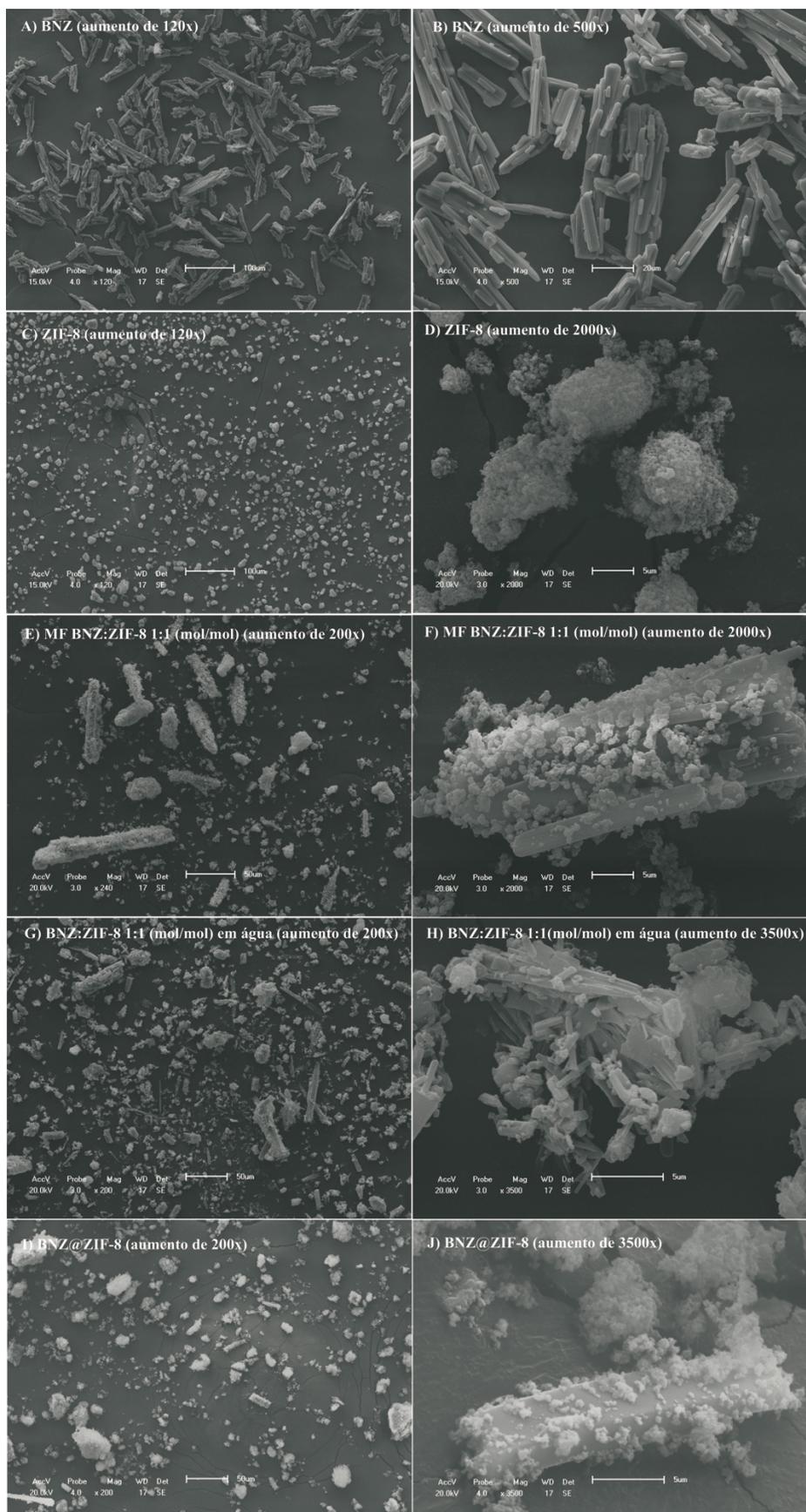
A MF BNZ:ZIF-8 (1:1 mol/mol) confirmou a informação sugerida pelo DRX acerca da adsorção física entre o fármaco e o excipiente. É possível observar a deposição dos cristais esféricos da ZIF-8 sobre a superfície dos regulares cristais de BNZ (Figura 20.e-f).

Em contrapartida, os sistemas oriundos do método de obtenção com solvente aquoso (BNZ:ZIF-8 mol/mol) – e com acetona (BNZ@ZIF-8), evidenciaram a redução do tamanho e alteração da morfologia dos regulares cristais de BNZ (Figura 20.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 DRX no que tange a formação do DDS

Isto pode indicar um aumento na taxa de dissolução do BNZ, devido ao aumento da área de superfície e do conseqüente maior grau de solvatação do cristal do fármaco. Este da velocidade de dissolução pode ser confirmado através da elucidação da curva de DSC – redução da E_a necessária para a fusão do fármaco – e do teste *in vitro* de dissolução (WANG & SHMEIS, 2006).

Figura 20 – Microscopia Eletrônica de Varredura do a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF BNZ:ZIF-8 (1:1 mol/mol); g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 mol/mol) obtido em meio aquoso; i) e j) BNZ@ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

5.1.7 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

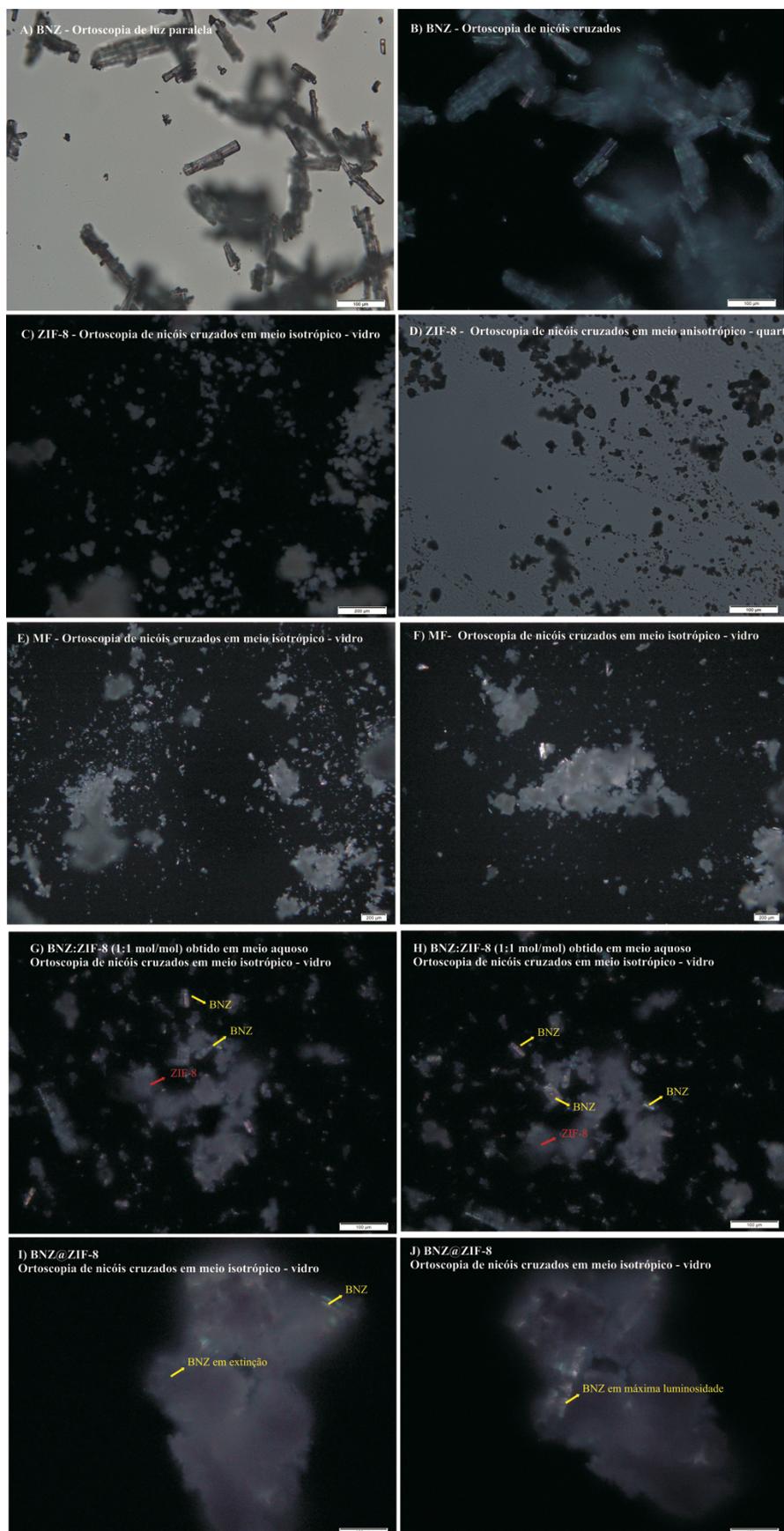
O BNZ foi observado em luz natural polarizada sob sistema de luz transmitida e mostrou transparência e forma de cristais prismáticos (Figura 21.a). Quando observada no sistema de iluminação ortoscópica com nicóis cruzados em luz transmitida polarizada foi colocada em um meio isotrópico (vidro) e os cristalitos 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 21.b). Este comportamento é típico de materiais cristalinos anisotrópicos (WEAVER, 2003; BIRREFRINGÊNCIA, 2014).

O presente trabalho foi pioneiro em caracterizar a ZIF-8 e derivados através da técnica de MLP. 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 seja transmitida em sua totalidade (Figura 21.c e 21.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, 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 obtidos BNZ:ZIF-8 1:1 em água e em acetona demonstraram as mesmas características iniciais das amostras analisadas em isolado. Entretanto, no sistema BNZ@ZIF-8, o comportamento anisotrópico do BNZ foi pouco observado (BNZ quase em extinção), o que sugere a redução do tamanho do cristal e conseqüente alteração do seu comportamento cristalino, embora não o leve ao estado amorfo. O fato é corroborado pelas análises de MEV e indica que pode haver um aumento da taxa de dissolução do fármaco, devido a redução do tamanho dos seus cristalitos. 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 21).

Figura 21 – Microscopia de Luz Polarizada do a) e b) BNZ; c) e d) ZIF-8; e) e f) MF; g) e h) BNZ:ZIF-8 (1:1 mol/mol) obtido em meio aquoso; BNZ@ZIF-8.



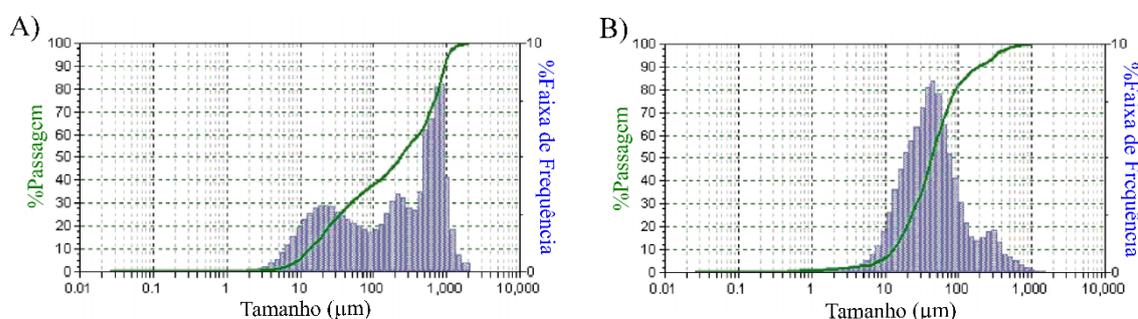
FONTE: Autoria própria.

5.1.8 Tamanho de Partícula por Granulometria à Laser e Análise de Área Superficial e Tamanho e Volume de Poros

Os gráficos da distribuição granulométrica das amostras de BNZ e ZIF-8 estão representados pelas figuras 22.a) e b). Os cristais de BNZ apresentaram tamanho de partícula entre 10 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 de 56,18 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$. Estes valores corroboram com sua lenta velocidade intrínseca de dissolução e justificam as deficientes propriedades de fluxo do mesmo (RHODES, 2008; SHEKUNOV et al., 2007).

A ZIF-8 apresentou cristais de tamanho variando entre 0,1 e 1069 μm , com tamanho médio de partícula de 379 μm (equivalente a mais de 80% da fração analisada), com valor de 1386,69 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$. Estes valores demonstram a capacidade da ZIF-8 em ser utilizada como carreador de DDS e apresentam-se em consonância com trabalhos importantes da área (HU et al., 2016; PARK et al., 2006; SUN; JU; LEE, 2012).

Figura 22 – a) Gráfico de tamanho de partícula por granulometria à laser do BNZ e b) da ZIF-8.



FONTE: Autoria própria.

As curvas de adsorção e dessorção indicam o tipo de porosidade do insumo farmacêutico ativo. O BNZ apresentou diâmetro médio de poro 35,42 Å, sendo um indicativo da presença de mesoporos (poros de uma largura interior de 20 e 500 Å) A ZIF-8 também demonstrou a presença de mesoporos (62,18 Å) (WEBB; ORR, 1997). Trabalhos recentes mostram a consonância destes resultados (PARK et al. 2006; HU et al., 2016). Contudo, Fang e Colaboradores (2015) evidenciaram, através de isotermas de adsorção/dessorção de N_2 , 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 e o sistema BNZ@ZIF-8 apresentaram, respectivamente, diâmetros de poro 42,46Å e 43,82Å, mantendo a natureza de mesoporos, com volume de poros aumentado 1,065 cm³.g⁻¹ e 0,602 cm³.g⁻¹. Esses resultados evidenciam o êxito na obtenção do sistema, pois a redução no tamanho de poro da associação em relação a ZIF-8 isolada sugere a presença das molécula de BNZ dispostas na rede de coordenação, interagindo com a ZIF-8 e diminuindo assim o seu tamanho de poro que, de 62,18 Å passou a ser 43,82 Å (BIDONE et al., 2009; CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENN, 2008). Os dados acima mencionados estão sumarizados na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da 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⁻¹)	Área de Superfície (método BET) (m².g⁻¹)	Volume de Poro (método BJH) (cm³.g⁻¹)	Tamanho do Poro (método BJH) (Å)
BNZ	0,30	56,18	0,050	35,42
ZIF-8	0,15	1386,69	0,73	62,18
MF			1,065	42,46
Sistema BNZ:ZIF-8 (acetona)			0,602	43,82

FONTE: Autoria Própria

5.1.9 Ensaio quantitativo de solubilidade

No presente trabalho, o ensaio quantitativo de solubilidade foi realizado a fim de identificar a condição *sink* para satisfazer as normas preconizadas pela Farmacopeia Brasileira para execução do ensaio de dissolução *in vitro*.

Notam-se algumas diferenças dos resultados deste ensaio (Tabela 8) com respeito aos valores de solubilidade descritos na literatura. A solubilidade aquosa do BNZ é citada em algumas publicações como 0,4 mg.mL⁻¹ (LAMAS et al., 2006), afastando-se consideravelmente do valor experimental encontrado de 0,2 mg.mL⁻¹ em água. Porém, os resultados encontrados no presente trabalho assemelham-se aos ensaios semi-quantitativos preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, confirmando a característica muito pouco solúvel do BNZ em relação à 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 8 – Média e desvio padrão da concentração de BNZ solúvel em água.

Dias	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	210,57 \pm 0,77
4	213,98 \pm 2,30
7	225,78 \pm 0,83

FONTE: Autoria própria

5.2 Testes de liberação *in vitro*

No ciclo de reprodução, o parasita estabelece mecanismos de ação capazes de favorecer a sua entrada no citosol da célula-hospedeira. Um destes mecanismos é a produção de substâncias ácidas, como a hemolisina, que possui maior atividade em pH mais ácido (5,5). Dados históricos evidenciaram que, durante o estágio evolutivo do *T. cruzi* o pH das células-hospedeiras é sempre abaixo de 6,0. Para comprovar tal fato, os pesquisadores inocularam soluções um pouco mais básicas (pH 6,2) e evidenciaram certo retardo no processo evolutivo do parasita (CESTARI et al., 2012; DIAS; COURA; YASUDA, 2014; SOUZA; CARVALHO; M., 2013).

Tais valores de pH são extremamente interessantes do ponto de vista farmacêutico para o desenvolvimento de DDS pH-dependentes pois, modulando a liberação do fármaco para que esta ocorra apenas em pH mais ácido, é possível evitar que haja intensa liberação do fármaco em pH sanguíneo e, com isso, evitar/reduzir a incidência de efeitos adversos e aumentar a seletividade do tratamento. As seguintes técnicas foram, então, realizadas para avaliar a liberação do BNZ da rede de coordenação da ZIF-8.

Como todas as técnicas realizadas demonstraram que o sistema BNZ@ZIF-8 foi o único a apresentar favorável resultado de EI%, este foi o único material utilizados nos testes a seguir.

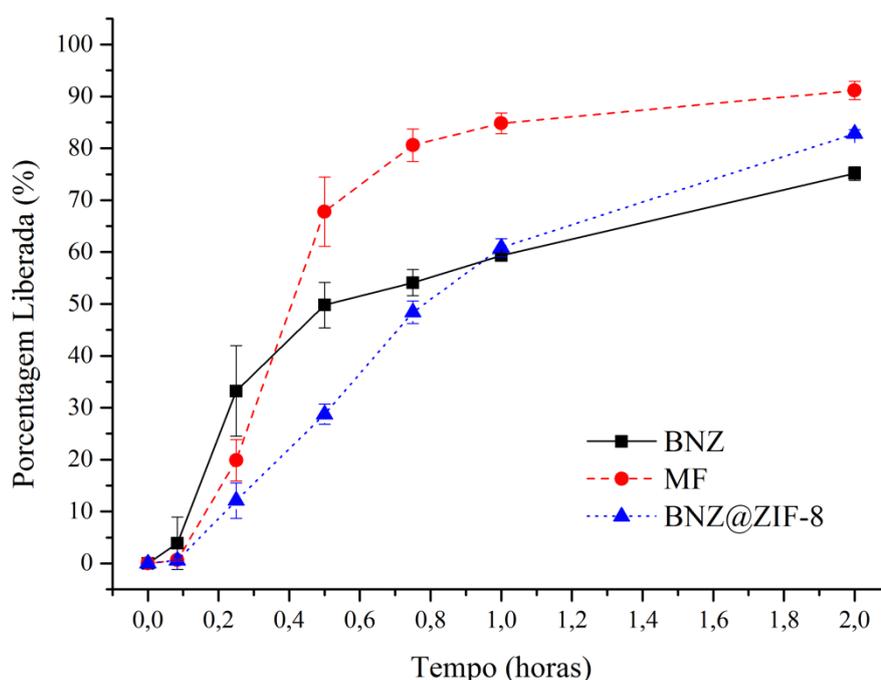
5.2.1 Ensaio de dissolução *in vitro* nas condições *sink*

Os perfis de dissolução do BNZ isolado, da MF e do sistema BNZ@ZIF-8, sob condições *sink* estão exibidos na Figura 23 (pH 4,5) e 24 (pH 7,6). A Figura 25 exhibe a comparação entre os perfis de dissolução do sistema nos diferentes pH's.

A Figura 23 demonstra que, em pH 4,5, o BNZ isolado finaliza o teste com uma porcentagem de fármaco liberado inferior quando comparado ao sistema, sendo uma boa parte já dissolvida no início da dissolução, um fenômeno conhecido como efeito *burst* (KESKIN; SEDA & KIZILEL, 2010) 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 mostrou certa modulação da liberação do fármaco, que ocorre mais lenta ao longo do tempo, em comparação à MF e ao BNZ isolado. Em 30 min, por exemplo, o BNZ e a MF já apresentam aproximadamente 50 e 68% de fármaco liberado, respectivamente, enquanto o sistema tem liberado apenas 27%. 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 ácido, fazendo com que a rede se desintegre e o fármaco seja liberado mais rapidamente.

Figura 23 – Perfil de dissolução nas condições sink do BNZ, MF e do sistema BNZ@ZIF-8 em pH 4,5.

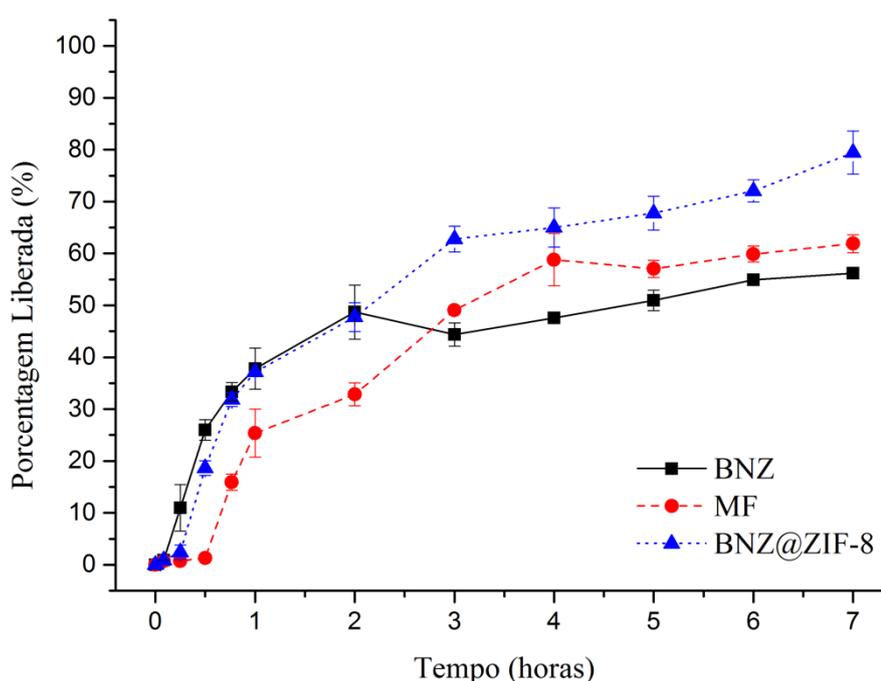


FONTE: Autoria própria.

Em paralelo, nos resultados expressos na Figura 24, verificou-se que em meio de 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 BNZ@ZIF-8 retêm 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, o sistema 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. Isto mostra que o sistema é capaz de não só modular a liberação do mesmo, mantendo-o em concentrações constantes – sugerindo a segurança do tratamento no que tange uma menor oscilação da concentração dentro da janela terapêutica –, mas também de incrementar a solubilidade do fármaco.

Figura 24 – Perfil de dissolução na condição sink do BNZ, MF e do sistema BNZ@ZIF-8 em pH 7,6.



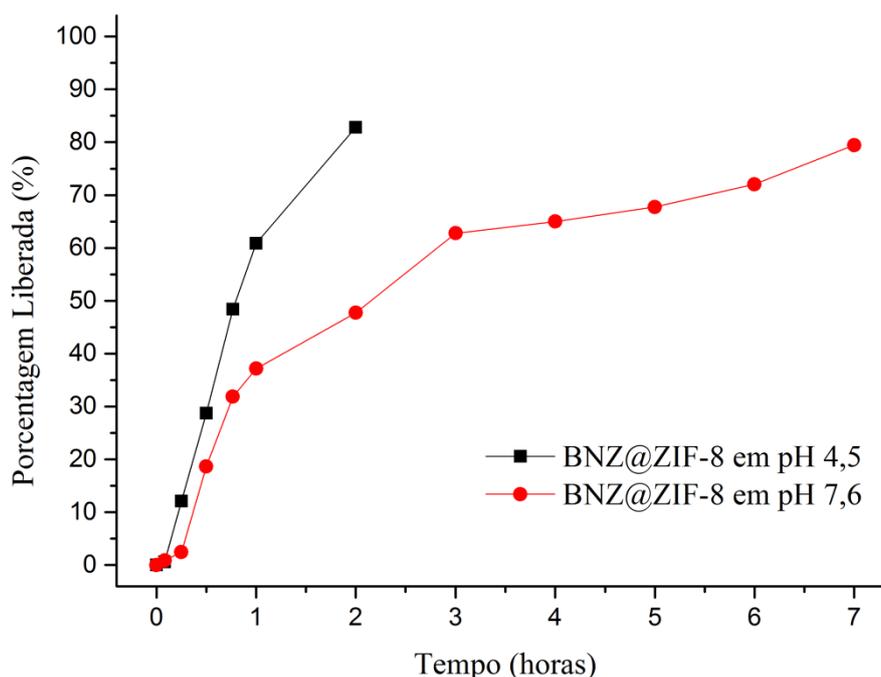
FONTE: Autoria própria.

Estes resultados mostram o êxito da obtenção de um DDS capaz de não apenas modular a liberação do fármaco, mas também aumentar a porcentagem dissolvida do mesmo em pH propício para sua absorção.

Comparando os dados supracitados, os resultados da Figura 25 demonstram que, em pH 4,5, a estrutura da ZIF-8 se dissocia rapidamente, liberando uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo. Já em meio com pH 7,6, a liberação de BNZ através do sistema se dá de forma controlada, aumentando gradualmente de acordo com os intervalos de tempo.

Resultados semelhantes, porém, com diferentes fármacos carreados, foram evidenciados por Vasconcelos e colaboradores (2012) e Sun e colaboradores (2012).

Figura 25 – Perfil de dissolução comparativo na condição sink do sistema BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.



FONTE: Autoria própria.

Estes resultados revelam a grande inovação do trabalho pois, enquanto permanece na corrente sanguínea – onde o pH varia entre 7,35-7,45 – o sistema BNZ@ZIF-8 seria capaz de liberar controladamente o fármaco. Entretanto, quando em contato com as células infectadas pelo *T. cruzi* – cujo pH é mais ácido (próximo a 5) – há uma liberação mais rápida do BNZ. No ciclo reprodutivo do parasita, a fase proliferativa ocorre devido ao rompimento do vacúolo fagocitário e liberação de 70% dos parasitas no citosol. Isto provavelmente ocorre devido à hemolisina, que possui atividade máxima em pH em torno de 5,5. Logo, espera-se que, nesta fase, o pH das células infectadas esteja em torno de 5,0-6,0 (SOUZA; CARVALHO; TECIA, 2013). Além disto, estudos recentes demonstram que o pH do interior de endossomas e lisossomas encontram-se na faixa de pH entre 5,0-6,0 e entre 4,5-5,0, respectivamente (REN et al., 2014b) Então, fica notório que teve-se o desenvolvimento de um DDS contendo o BNZ como agente antiparasitário para o tratamento alternativo da doença de Chagas.

Os resultados dos perfis de dissolução são confirmados quando analisados em relação à AUC e suas respectivas médias e desvio padrão (Tabelas 9 e 10). 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 9 demonstram que a AUC da maioria do intervalo de tempo das MF em pH 4,5 foi superior quando comparada ao BNZ isolado. Além disso, comparando as AUC's das MF e BNZ com o sistema BNZ@ZIF-8, mantendo a mesma proporção de BNZ, observa-se que os valores no sistema são sempre mais baixos, o que sugere a modulação da liberação do fármaco. No entanto, os valores foram considerados estatisticamente semelhantes através de teste ANOVA *one-way* e de desvio padrão.

Tabela 9 – Valores médios de AUC do BNZ, da MF e do sistema BNZ@ZIF-8 nas condições *sink* e em pH 4,5.

Tempo (horas)	AUC (min.µL).mL⁻¹ em pH 4,5		
	BNZ	MF	BNZ@ZIF-8
0,083	0,16	0,02	0,02
0,25	2,29 ± 0,55	1,44 ± 0,72	0,87 ± 0,29
0,5	11,23 ± 1,57	11,96 ± 3,39	5,51 ± 0,96
0,75	24,22 ± 2,43	30,51 ± 5,32	14,29 ± 2,18
1	38,39 ± 2,71	51,19 ± 5,96	27,10 ± 3,37
2	105,63 ± 1,90	139,18 ± 7,22	98,62 ± 3,83

FONTE: Autoria própria.

Paralelamente, verificou-se que em pH 7,6 (Tabela 10), até as três primeiras horas, o sistema obteve valores de AUC inferiores ao BNZ isolado, mostrando a modulação da liberação do fármaco que ocorre de maneira prolongada e, após esse tempo, foram observados valores superiores aos apresentados pelo fármaco isolado. No entanto, os valores obtidos foram considerados estatisticamente semelhantes. Fica evidente que 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 10 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e sistema BNZ@ZIF-8 em pH 7,6 sob condições sink.

Tempo (horas)	AUC (min.µL).mL ⁻¹ em pH 7,6		
	BNZ	MF	BNZ@ZIF-8
0,083	0,03	0,03	0,03
0,25	1,02 ± 0,38	0,15	0,31 ± 1,12
0,5	5,64 ± 1,19	0,41 ± 0,02	3,04 ± 2,04
0,75	13,46 ± 1,81	2,71 ± 1,86	9,77 ± 6,75
1	21,68 ± 2,59	7,52 ± 4,92	17,12 ± 11,20
2	64,93 ± 7,18	32,96 ± 17,58	56,90 ± 28,35
3	110,80 ± 11,76	70,25 ± 23,68	110,50 ± 44,15
4	156,12 ± 14,09	124,17 ± 20,91	172,73 ± 57,86
5	205,41 ± 14,45	182,08 ± 17,56	239,10 ± 70,87
6	258,36 ± 16,68	240,53 ± 15,98	305,84 ± 79,55
7	313,90 ± 17,30	301,42 ± 14,35	378,40 ± 86,57

FONTE: Autoria própria.

Embora não tenham sido obtidos resultados significativos no tocante de incremento de solubilidade do fármaco, é possível observar uma mudança no perfil de liberação de acordo com o pH utilizado. A fim de garantir que houve, de fato, uma modulação da liberação do BNZ em diferentes pH, foi realizado um estudo da cinética de liberação do fármaco através de diferentes métodos: modelo-dependente e modelo-independentes.

Como método modelo-dependente, foram testados diferentes modelos cinéticos de liberação. Estes tiveram números de parâmetros diferentes, o que pode aumentar o valor de R² devido a sobreajustes que podem ocorrer. Neste contexto, o R²_{ajustado} tende a reduzir esse sobreajuste sendo, portanto, o coeficiente utilizado para a escolha do melhor modelo (ZHANG et al., 2010).

Conforme observado pelos valores do R²_{ajustado} foi possível evidenciar a modulação da liberação do fármaco comparando o BNZ isolado e o sistema BNZ@ZIF-8, uma vez que os materiais demonstraram ajustes à diferentes modelos cinéticos (Tabela 11). Em pH 4,5, o BNZ demonstrou aplicabilidade ao método Korsmeyer-Peppas e o sistema ao de Primeira Ordem. Já em pH 7,6, o BNZ continuou se ajustando ao mesmo modelo, enquanto o sistema se adequou ao modelo de Peppas-Sahlin, comprovando a modulação da liberação.

Desta forma, o passo seguinte foi comparar os diferentes pH's a fim de verificar se houve a liberação pH-dependente do fármaco a partir do sistema BNZ@ZIF-8. Em pH 4,5 (Tabela 11) os melhores modelos cinéticos para o sistema foram, em ordem decrescente: 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.

Os modelos de primeira ordem e Peppas-Sahlin foram, então, os determinados para o sistema, conforme 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 é confirmado pela rápida desintegração da rede organometálica em pH 4,5, liberando grande parte do BNZ em pouco tempo de ensaio.

Tabela 11 – Coeficientes de determinação (R^2) e R^2_{ajustado} obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando o BNZ e sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's (4,5 e 7,6) nas condições *sink* do ensaio de dissolução *in vitro*.

Modelos	BNZ		BNZ@ZIF-8		BNZ		BNZ@ZIF-8	
	pH 4,5				pH 7,6			
	R^2	R^2_{ajustado}	R^2	R^2_{ajustado}	R^2	R^2_{ajustado}	R^2	R^2_{ajustado}
Ordem zero	0,7649	0,7178	0,9334	0,9200	0,6816	0,6462	0,8544	0,8382
Primeira ordem	0,9097	0,8917	0,9953	0,9944	0,7675	0,7417	0,9307	0,9230
Higuchi	0,7119	0,6543	0,9248	0,9098	0,7489	0,7210	0,8721	0,8578
Korsmeyer-Peppas	0,9614	0,9518	0,9647	0,9559	0,9394	0,9243	0,9081	0,8851
Peppas-Sahlin	0,9125	0,8542	0,9930	0,9883	0,7489	0,5816	0,9810	0,9683

FONTE: Autoria própria.

Em relação ao modelo Peppas-Sahlin, as constantes K_1 e K_2 (Tabela 12) representam, respectivamente, a influência da difusão e do relaxamento do carreador na liberação da droga. O maior valor encontrado foi o de K_1 , significando que a influência que a difusão exerce sobre a liberação do fármaco é maior que o próprio relaxamento da rede organometálica. Assim, a liberação do BNZ ocorre por difusão, onde o fármaco é transportado de um local para outro situado no interior do carreador, resultando em um conjunto de movimentos moleculares aleatórios que ocorrem em pequenas distâncias (PEPPAS; SAHLIN, 1989)

Em seguida, foi calculado o coeficiente de liberação (n) através da equação de Korsmeyer. Esta geralmente é utilizada para interpretar e descrever a liberação 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 à lei de Fick ou transporte Fickiano, e outro em consequência dos fenômenos de

intumescimento/relaxamento. Nas condições de dissolução estudadas, o n (obtido da equação de regressão linear) encontrado teve valor acima de 1 (Tabela 12), classificando-se como transporte super caso II, onde a taxa de difusão é superior a de relaxamento, sendo controlados pela velocidade de migração da fronteira entre o carreador e o núcleo, corroborando com os resultados encontrados pelo modelo Peppas-Sahlin (KORSMEYER et al., 1983; PEPPAS; SAHLIN, 1989).

Tabela 12 – Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's nas condições *sink*.

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.

Observando os resultados obtidos até então pode-se evidenciar que o fármaco é rapidamente liberado em ambiente acidificado (devido a dissociação da rede de coordenação). Em contrapartida, em pH mais elevado (pH 7,6) é possível observar uma liberação mais lenta e gradual, onde o fármaco é liberado por difusão. Ainda pode ocorrer relaxamento da rede organometálica, caracterizada pelo seu fenômeno de “respiração”. Conseqüentemente, 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 DDS vetorizador às células infectadas pelo parasita na doença de Chagas.

Outro método aplicado para comparar a semelhança entre os perfis de dissolução foi o modelo-independente simples. Neste modelo são avaliados os fatores de diferença ($f1$) e de semelhança ($f2$). O $f1$ calcula a porcentagem de diferença entre os dois perfis avaliados em tempos de coletas iguais e corresponde a uma medida de erro relativo entre os mesmos. Já o $f2$ é um indicativo da semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis. Devido sua fácil interpretação, a RDC 31/2010 – que dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo – indica a utilização apenas do $f2$ para considerar a semelhança entre perfis de dissolução que, neste caso, é atestada quando o valor está compreendido entre 50 e 100 (BRASIL, 2010; DE BRUM et al., 2012).

O f_2 foi utilizado com o intuito de corroborar os dados obtidos no tocante da obtenção de perfis de dissolução diferentes (BRASIL, 2010). Como mostrado na tabela 13, os valores resultantes da comparação dos perfis de dissolução entre BNZ e MF e entre BNZ e sistema, tanto em pH 4,5 quanto em 7,6; foram maiores do que 100, caracterizando que, de fato, teve-se uma modulação da liberação do fármaco.

Tabela 13 – Valores dos fatores de semelhança f_2 comparando os perfis de dissolução *in vitro* nas condições *sink* BNZ-MF e BNZ-BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.

Perfil de dissolução comparativo	f_2	
	pH 4,5	pH 7,6
BNZ-MF	196,11	187,35
BNZ-BNZ@ZIF-8	182,02	190,22

FONTE: Autoria própria

5.2.2 Ensaio de dissolução *in vitro* sob condições *non-sink*

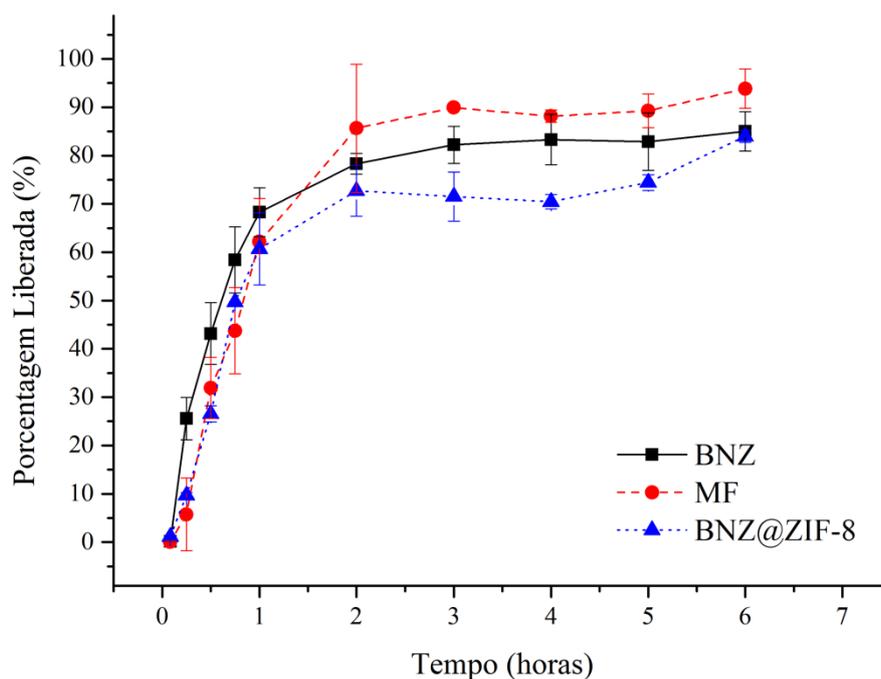
A correlação *in vitro-in vivo* sob condição *sink* pode ser considerada um problema, já que a capacidade de supersaturação das substâncias estudadas, que também pode acontecer *in vivo*, pode não ser visualizada sob estas condições. Assim, trabalhos recentes vêm usando a condição *non-sink* para visualizar etapas de supersaturação, além de nucleação e cristalização de fármacos, processos que ocorrem comumente no TGI (COSTA, 2016; DINUNZIO et al., 2008; DINUNZIO et al., 2010; SUN; JU; LEE, 2012).

Em pH 4,5, o BNZ mostra rápida liberação em efeito *burst* na primeira hora de dissolução, chegando a aproximadamente 64% de fármaco liberado. A partir de então o fármaco é liberado gradualmente, atingindo 80% em 3h. Essa concentração se mantém praticamente em equilíbrio até o fim do experimento, sugerindo o alcance da concentração de saturação do meio.

Em paralelo, a MF e o sistema BNZ@ZIF-8 apresentam perfis semelhantes entre si. Estes demonstram a redução do efeito *burst*, liberando o fármaco mais lentamente. Entretanto, na primeira hora de dissolução, a porcentagem liberada é praticamente a mesma para o BNZ isolado, a MF e o sistema. A partir daí os materiais apresentam comportamentos diferentes. A MF libera o fármaco rapidamente, chegando a 96% de fármaco liberado no final do experimento, o que corresponde a uma solubilidade 8,31% maior quando comparado ao BNZ isolado, ainda que não seja considerado significativo do ponto de vista estatístico.

Já o sistema alcança 80% de fármaco liberado em apenas 6h de dissolução, ocorrendo de maneira bem mais lenta, caracterizando uma liberação prolongada. Vale salientar que o experimento termina com uma curva ascendente, sugerindo que uma porcentagem maior de fármaco seria alcançado se o experimento fosse prosseguido. Esses resultados são interessantes pois, como visto nos estudos de dissolução realizados na condição *sink* (subitem 5.2.1), em pH mais ácido, a ZIF-8 se expande e sofre erosão, o que poderia promover uma liberação bem mais rápida do fármaco. Os resultados supracitados estão sumarizados na figura 26.

Figura 26 – Perfil de dissolução nas condições non-sink do BNZ, MF e sistema BNZ@ZIF-8 em pH 4,5.



FONTE: Autoria própria.

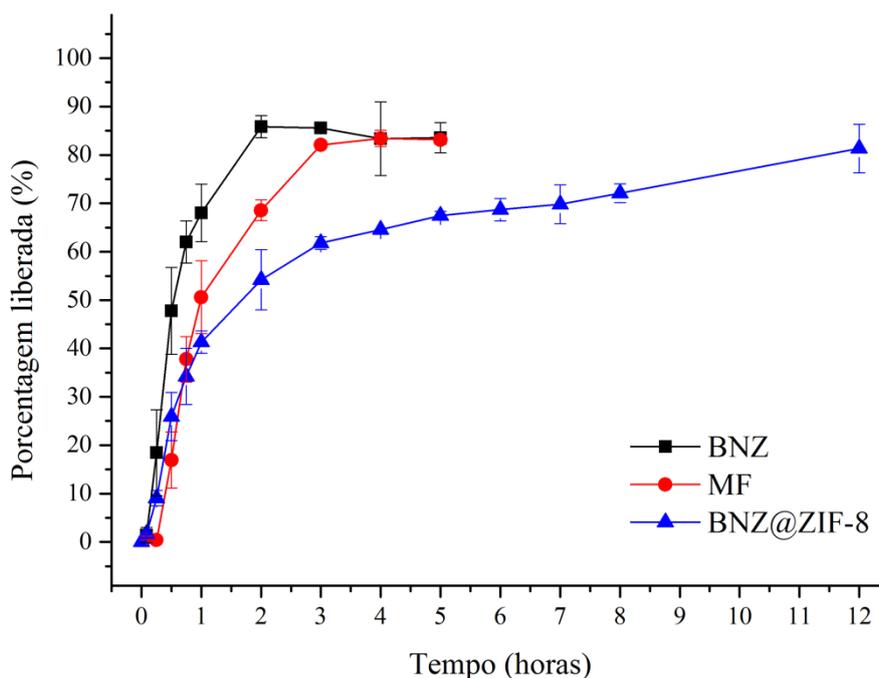
Em pH 7,6, o BNZ apresenta intenso efeito *burst*, alcançando 63% de liberação já na primeira hora de dissolução. A partir deste ponto a liberação se dá de maneira rápida, chegando a 80% já na segunda hora, atingindo um patamar que corresponde a saturação do meio, onde permanece em equilíbrio até o final do experimento.

A MF apresenta uma redução do efeito *burst* e a liberação ocorre de maneira mais lenta. Na primeira hora de dissolução apresenta apenas 47% de fármaco liberado e, a partir daí,

apresenta liberação lenta e gradual, mostrando menores valores até o ponto 3h, onde atinge porcentagem liberada semelhante ao BNZ isolado, permanecendo nesse patamar por também corresponder à saturação do meio.

Já o sistema reduziu drasticamente o efeito *burst* evidenciado pelos outros materiais. A liberação ocorre de maneira bem mais prolongada tendo, na primeira hora de dissolução, liberado apenas 38% de fármaco (quase metade do que foi observado para o fármaco isolado). A liberação prolongada do fármaco é observada durante todo o curso de dissolução, lenta, mas crescente, atingindo 80% de liberação do fármaco apenas após 12 horas de experimento. Vale salientar ainda que o gráfico mostra o término do experimento ainda em uma curva ascendente, sugerindo a continuidade da liberação do ativo ao longo do tempo. Estes resultados mostram, de fato, o promissor efeito pH-dependente deste DDS, principalmente ao analisar que a condição *non-sink* está presente no TGI e que isto afeta diretamente a absorção de formas farmacêuticas sólidas orais. A figura 27 sumariza os resultados acima citados.

Figura 27 – Perfil de dissolução nas condições *non-sink* do BNZ, MF e sistema BNZ@ZIF-8 em pH 7,6.

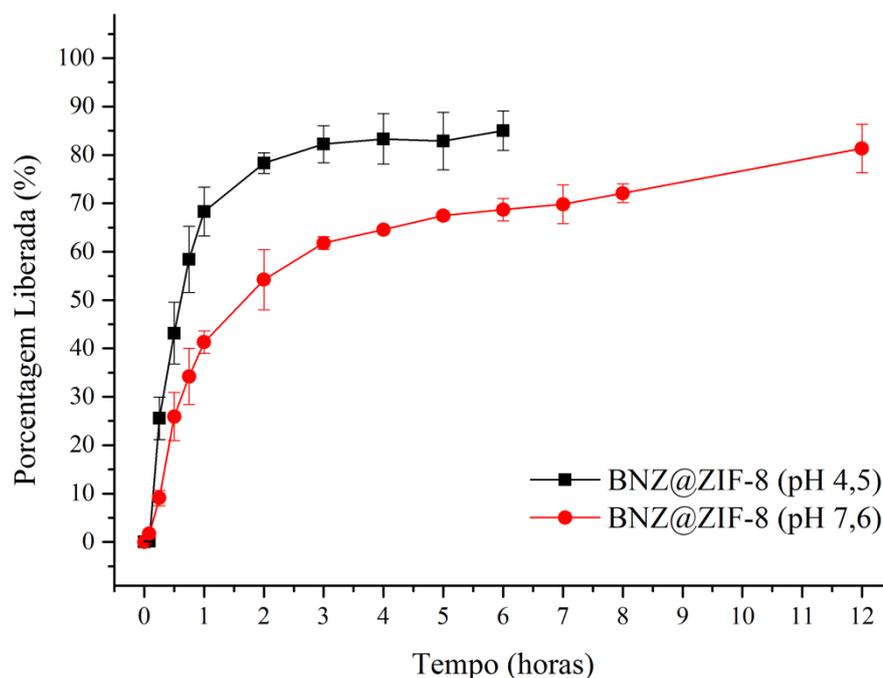


FONTE: Autoria própria

Assim, fica evidente que houve uma liberação pH-dependente do fármaco, bem como foi evidenciado para a dissolução na condição *sink*. Em pH 4,5 a liberação ocorre de maneira rápida, devido dissociação da rede da ZIF-8 e difusão do fármaco. Entretanto, ocorre de maneira mais prolongada que em condição *sink*, pois o fármaco só atinge 80% de liberação em apenas 6 horas enquanto, neste mesmo intervalo de tempo, o complexo tem liberado menos de 70%. Já em pH 7,6, a liberação de 80% de BNZ só ocorre após 12 horas. Isto implica dizer que a eficiência do DDS em modular a liberação do fármaco conforme muda o pH é mantida mesmo nas condições *non-sink*, mais comumente encontradas no TGI para fármaco de SCB classe II. Neste caso, o delineamento de formas farmacêuticas orais terá de ser feito a fim de se evitar o pH gástrico (1,2), visando proteger o sistema das intempéries desta condição. Isto pode ser feito através do revestimento pelicular dos comprimidos, por exemplo.

A figura 28 esquematiza uma comparação entre a liberação do BNZ a partir do BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6 sob estas condições.

Figura 28 – Perfil de dissolução comparativo na condição *non-sink* do sistema BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.



FONTE: Autoria própria.

Estes resultados são corroborados através da análise da AUC. É possível observar que, em pH 4,5 (tabela 14), os valores da AUC da MF e do sistema são sempre menores do que os valores observados para o fármaco isolado, porém, estatisticamente semelhantes. Entretanto, a partir do ponto 3h, o sistema apresenta valores menores que o BNZ e a MF, sugerindo que o material, de fato, é capaz de modular discretamente a liberação do fármaco, enquanto a MF permanece com valores semelhantes ao fármaco isolado. Estes resultados já eram esperados devido a dissociação da estrutura da rede da ZIF-8.

Tabela 14 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e BNZ@ZIF-8 em pH 4,5 sob condições *non-sink*.

AUC (min.µL).mL⁻¹ em pH 4,5 (condição <i>non-sink</i>)			
Tempo (horas)	BNZ	MF	BNZ@ZIF-8
0,083	0	0	0
0,25	1,70 ± 0,84	0,44 ± 0,61	0,82 ± 1,81
0,5	9,16 ± 2,77	4,16 ± 3,23	4,96 ± 4,69
0,75	21,20 ± 4,15	12,81 ± 6,91	13,68 ± 6,36
1	36,25 ± 5,41	26,145 ± 10,91	26,97 ± 7,16
2	105,94 ± 7,96	94,43 ± 25,56	91,91 ± 15,56
3	183,18 ± 7,50	177,57 ± 33,56	160,82 ± 25,03
4	265,74 ± 5,64	263,96 ± 40,75	230,66 ± 31,10
5	347,76 ± 4,65	352,56 ± 48,31	302,24 ± 33,97
6	433,83 ± 4,63	446,21 ± 52,08	383,42 ± 39,50

FONTE: Autoria própria

Em pH 7,6 (Tabela 15) a MF apresenta menores valores de AUC, tanto em relação ao BNZ, quanto ao sistema, até o ponto 1h. A partir de então a MF se assemelha ao fármaco isolado na condição de saturação do meio. Já o sistema, a partir do ponto 2h, apresenta valores menores até o fim do experimento. Além disso, mesmo enquanto o BNZ e a MF atingem a saturação do meio, o sistema continua liberando o fármaco por até 12h (onde atinge 80%). Assim, fica evidente que o sistema é capaz de prolongar a liberação do BNZ, em condições *non-sink*, como as situações observadas durante a absorção de fármacos por via oral.

Os mesmos modelos de cinética de liberação aplicados no item 5.2.1 também foram utilizados visando a corroboração da obtenção de perfis modulados de liberação nas condições *non-sink*. O R^2_{ajustado} foi também adotado a fim de reduzir o sobreajuste da aplicação dos métodos. Conforme verificado pelos valores de R^2_{ajustado} , os modelos que mais se aplicaram às dissoluções em pH 4,5 e 7,6 foram, respectivamente, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin.

Tabela 15 – Valores médios de AUC do BNZ, MF e BNZ@ZIF-8 em pH 7,6 sob condições *non-sink*.

AUC (min.µL).mL⁻¹ em pH 7,6 (condição <i>non-sink</i>)			
Tempo (horas)	BNZ	MF	BNZ@ZIF-8
0,08333	0	0	0
0,25	1,25 ± 1,10	0,09 ± 0,03	0,82 ± 0,76
0,5	8,04 ± 3,99	1,50 ± 1,64	4,81 ± 2,47
0,75	20,25 ± 5,58	7,16 ± 3,84	11,70 ± 3,67
1	35,27 ± 5,64	17,30 ± 3,49	20,44 ± 5,30
2	106,96 ± 16,55	72,30 ± 0,78	64,87 ± 13,53
3	187,47 ± 36,70	142,27 ± 3,49	119,15 ± 26,00
4	267,83 ± 40,67	219,82 ± 5,95	178,76 ± 38,62
5	348,25 ± 45,94	299,94 ± 8,07	241,68 ± 48,05
6			307,23 ± 58,26
7			374,64 ± 69,22
8			444,40 ± 77,23
12			747,77 ± 94,31

FONTE: Autora própria

Os valores do R^2_{ajustado} evidenciaram a modulação da liberação do fármaco comparando o BNZ isolado e o sistema BNZ@ZIF-8, uma vez que apresentam ajustes a modelos diferentes (Tabela 16, em cinza). Em pH 4,5, o BNZ demonstrou aplicabilidade ao método Peppas-Sahlin e o sistema BNZ@ZIF-8, ao Korsmeyer-Peppas. Já em pH 7,6, o BNZ ajustou-se a outro modelo, o de Korsmeyer-Peppas – exibindo um comportamento diferente do observado em condição *sink* –, enquanto o sistema se adequou ao modelo de Peppas-Sahlin.

Em seguida, procedeu-se a avaliação da liberação pH-dependente do fármaco a partir do sistema BNZ@ZIF-8 comparando os modelos cinéticos entre os diferentes pH's. Para a dissolução em pH 4,5 os modelos cinéticos mais aplicáveis para o sistema foram, em ordem decrescente: Korsmeyer-Peppas > Peppas-Sahlin > Higuchi > Primeira ordem > Ordem zero. Já em pH 7,6, o sistema obedeceu aos modelos cinéticos na seguinte ordem decrescente: Peppas-Sahlin > Primeira Ordem > Korsmeyer-Peppas > Higuchi > Ordem zero. Enquanto houve uma mudança quanto ao ajuste ao modelo cinético em pH 4,5 quando comparado com as condições *sink*, em pH 7,6 a ordem supracitada foi exatamente a mesma. É, então, notório que, em condições *non-sink*, ambos os pH's analisados demonstram modelos cinéticos que se adequam a uma liberação caracterizada como prolongada. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 16.

Korsmeyer e colaboradores (1983) desenvolveram o método capaz de verificar a liberação de um fármaco a partir de uma matriz polimérica. No método, para determinar o mecanismo de liberação, deve-se levar em consideração os primeiros 60% de liberação do fármaco. Para o caso de comprimidos cilíndricos, o valor de $n \geq 0,45$ corresponde a um mecanismo de difusão Fickiana, entre $0,45 < n < 0,89$, uma difusão não-Fickiana, para $n = 0,89$ tem-se o relaxamento do polímero, e para $n > 0,89$ um transporte super caso II (tabela 1) (DASH et al., 2010).

Tabela 16 – Coeficientes de determinação (R^2) e $R^2_{ajustado}$ obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando o BNZ e sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's (4,5 e 7,6) nas condições *non-sink* do ensaio de dissolução *in vitro*.

Modelos	BNZ		BNZ@ZIF-8		BNZ		BNZ@ZIF-8	
	pH 4,5				pH 7,6			
	R^2	$R^2_{ajustado}$	R^2	$R^2_{ajustado}$	R^2	$R^2_{ajustado}$	R^2	$R^2_{ajustado}$
Ordem zero	0,6641	0,6221	0,6249	0,5780	0,5049	0,4599	0,7447	0,7214
Primeira ordem	0,8748	0,8592	0,7601	0,7301	0,7089	0,6824	0,9004	0,8913
Higuchi	0,6463	0,6021	0,7992	0,7741	0,7119	0,6857	0,8491	0,8354
Korsmeyer-Peppas	0,8626	0,8454	0,9915	0,9904	0,9614	0,9579	0,8956	0,8862
Peppas-Sahlin	0,9997	0,9996	0,9842	0,9797	0,9125	0,9045	0,9896	0,9875

FONTE: Autoria própria.

O método de Korsmeyer-Peppas demonstrou boa aplicabilidade, uma vez que a ZIF-8 é um polímero de coordenação e, por se tratar de uma matriz polimérica, satisfaz o método. Além disso, o valor de $n = 1,64$ corresponde a um transporte super caso II, sugerindo que mais do que um mecanismo pode estar envolvido na cinética de liberação do BNZ, referindo-se à combinação de relaxamento e erosão, seguido de difusão do fármaco a partir da rede da ZIF-8, sendo a difusão o mecanismo mais significativo (STEINGRÄBER; SHTOLTZ; RODRIGUES, 2008; ARORA et al., 2011; DASH et al., 2010; KHALID et al., 2014).

Vale salientar que, ao analisar o modelo de Peppas-Sahlin – que também apresentou boa aplicabilidade –, os valores de k_1 são menores que k_0 , o que indica que a liberação da droga foi controlada principalmente por difusão Fickiana, juntamente com a contribuição do relaxamento da cadeia polimérico, característico do mecanismo de transporte caso II. Um estudo recente de Khalid e colaboradores (2014) mostrou comportamento semelhante ao avaliar o mecanismo de liberação de comprimidos mucoadesivos à base de flurbiprofeno.

Estes resultados são mais expressivos do que aqueles que foram obtidos nas condições *sink*, uma vez que, em pH ácido, a ZIF-8 se dissocia mais rapidamente. Enquanto isso ocorre, o meio de dissolução entra na matriz, dissolve o fármaco e o difunde para o exterior. Desta

forma, fica claro que o transporte do tipo super caso II é o mais pertinente, já que ele é característico de materiais que apresentam todos os tipos de mecanismo de liberação: intumescimento/relaxamento e difusão.

Já em pH 7,6 o mecanismo de liberação nas condições *non-sink* foi o mesmo evidenciado nas condições *sink*. O método mais pertinente foi o Peppas-Sahlin, com valor de $K_1 > K_2$, caracterizando um papel mais evidente da difusão como mecanismo de liberação do fármaco. Além disso, quando calculado o coeficiente de liberação (n) através da equação de Korsmeyer (tabela 17), é possível constatar que o mecanismo de liberação segue também o tipo de transporte super caso II ($n > 0,89$), similar ao que ocorreu no mesmo pH em condição *sink* e em pH 4,5 nas condições *non-sink*. Isto mostra que uma associação de todos os mecanismos de liberação está envolvida no ensaio de dissolução *in vitro* do BNZ sob condições *non-sink*.

Fica então notório que ambos os modelos conseguiram modular de maneira prolongada a liberação do fármaco, visto que os modelos Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin são característicos de formulação prolongada. Estes resultados já eram esperados devido o uso das condições *non-sink*.

Tabela 17 – Constantes e coeficientes de liberação obtidos a partir do ajuste a modelos cinéticos utilizando sistema BNZ@ZIF-8 em diferentes pH's nas condições *non-sink*.

Modelos	pH 4,5		pH 7,6	
	K_1	K_2	K_1	K_2
Peppas-Sahlin	1,89	-1,92	0,72	-2,59
	n		n	
Korsmeyer-Peppas	1,64		0,91	

FONTE: Aatoria própria

Em relação ao método modelo-independente, como analisado nas condições *sink*, os valores de f_2 nas condições *non-sink* também demonstraram a obtenção de perfis modulados de liberação do fármaco em ambos os pH's 4,5 e 7,6 (Tabela 18), uma vez que todos os resultados obtidos foram maiores que 100, logo, os perfis comparativos entre BNZ e a MF e entre o BNZ e o BNZ@ZIF-8, foram diferentes.

Tabela 18 – Valores dos fatores de semelhança f_2 comparando BNZ-MF e BNZ-BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.

Perfil de dissolução comparativo	f_2	
	pH 4,5	pH 7,6
BNZ-MF	157,45	200,85
BNZ-BNZ@ZIF-8	196,17	217,34

FONTE: Autoria própria

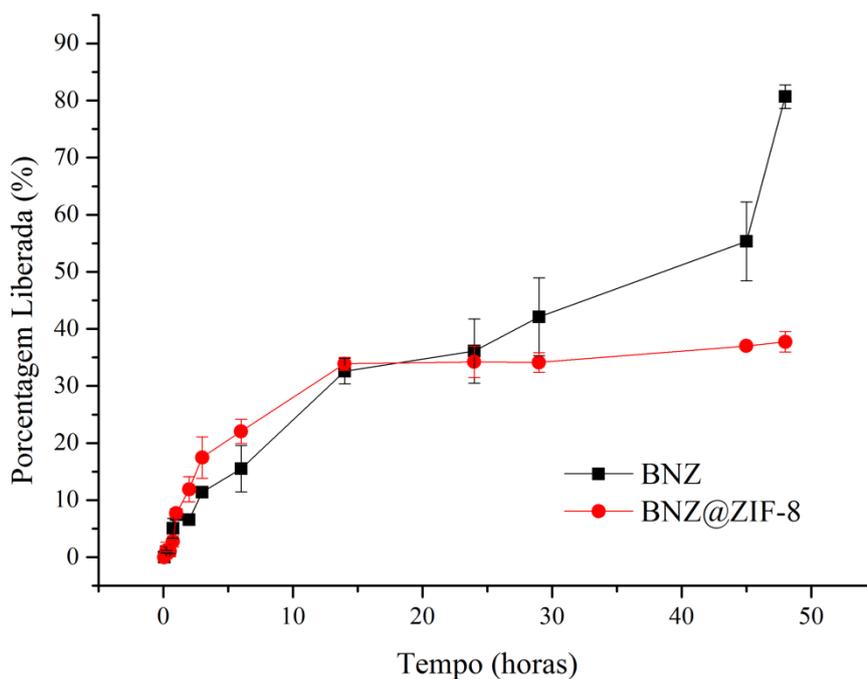
5.2.3 Liberação *in vitro* por diálise

O ensaio de liberação *in vitro* através de uma membrana de diálise foi realizado a fim de comparar estes resultados com os ensaios de dissolução *in vitro* e de estimar a permeação do BNZ a partir da rede da ZIF-8. A passagem do fármaco é permitida devido o tamanho da molécula (cerca de 260,25 Da) ser menor que o tamanho da abertura dos poros da membrana (1000 Da). Já a permeação da ZIF-8 é dificultada pois trata-se de um polímero e as moléculas permeiam ao passo que a rede da ZIF-8 é dissociada. Por não apresentar a modulação da liberação esperada, a MF foi excluída deste ensaio pois não apresentou perfil de dissolução considerado significativo.

Em pH 4,5 (Figura 29), o BNZ atingiu a porcentagem de liberação de 80% em cerca de 48 horas em uma cinética de liberação quase linear. Já o sistema BNZ@ZIF-8, no mesmo intervalo de tempo, apresentou uma liberação de apenas 34%, mais lenta e sem oscilações. Até aproximadamente 25 horas o fármaco e o sistema exibem uma liberação semelhante, aproximadamente 39 e 35%, respectivamente. No entanto, a partir deste ponto o sistema apresenta a formação de um platô, estabilizando a liberação do fármaco nesta mesma faixa até o fim do experimento, enquanto o fármaco isolado continua sendo liberado de maneira linear, atingindo rapidamente a porcentagem esperada para o término do ensaio.

Visando comparar os perfis de dissolução entre o BNZ e o sistema, foi utilizado o método modelo-independente que calcula do valor de f_2 . O valor de 190,87 evidencia que o perfil de liberação é diferente ($f_2 > 100$).

Figura 29 – Ensaio de liberação in vitro a partir de membrana de diálise (1 kDa) nas condições sink em pH 4,5 do BNZ e do sistema BNZ@ZIF-8

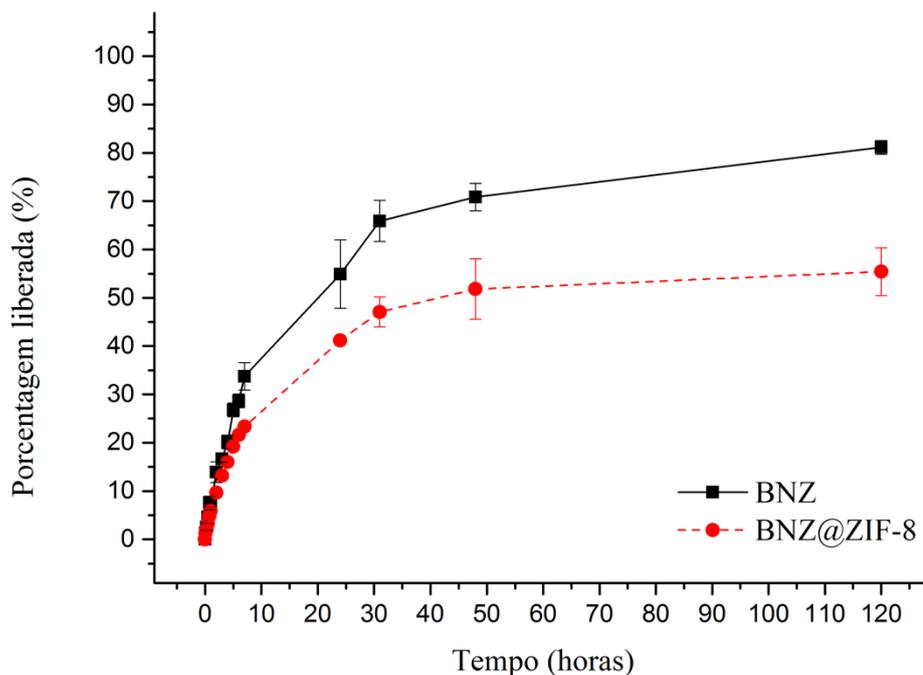


FONTE: Autoria própria.

Em pH 7,6 (Figura 30), o BNZ isolado atingiu a porcentagem de 80% após 120 horas de ensaio, justificado pela sua baixa solubilidade aquosa. Já o sistema BNZ@ZIF-8 apresentou uma liberação mais lenta, excluindo o efeito *burst* apresentado pelo BNZ isolado. No ponto 7h, o BNZ isolado já apresenta quase 40% de fármaco liberado, enquanto o BNZ@ZIF-8 libera apenas 23%. Essa diferença de porcentagem – de aproximadamente 20% –, se mantém constante até as 120 horas, onde o sistema atinge apenas 57% de liberação do fármaco.

Foi possível observar que houve, de fato, a modulação da liberação do fármaco, visto que os perfis de liberação não foram semelhantes, uma vez que o valor de f_2 encontrado foi de 213,06 (>100).

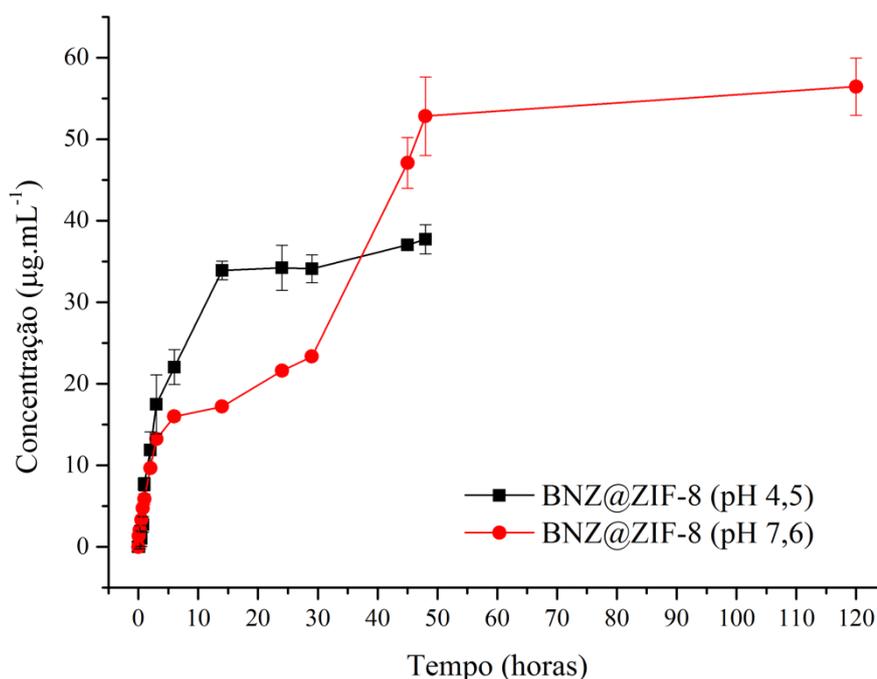
Figura 30 – Ensaio de liberação *in vitro* a partir de membrana de diálise (1 kDa) nas condições *sink* em pH 7,6 do BNZ e do sistema BNZ@ZIF-8.



FONTES: Autoria própria.

A figura 31 traz uma comparação entre os resultados obtidos da diálise em diferentes pH's em condição *sink*. Foi possível evidenciar que em pH 4,5 a liberação é rápida, com efeito *burst* pronunciado quase linear, liberando cerca de 34% em 14 horas. Em seguida, é observada uma manutenção da concentração em platô, atingindo aproximadamente 38% de liberação até o final do experimento (48h). Em pH 7,6, observa-se uma atenuação do efeito *burst*, visto que apenas 17% é liberado no mesmo intervalo de tempo de 14 horas. A liberação segue de maneira lenta, modulada, com cerca de 53% liberado em 48 horas, onde se estabelece um equilíbrio, visto que até 120 horas a liberação é de cerca de 56%. Mais uma vez teve-se a corroboração de que foi desenvolvido um DDS capaz de vetorizar a liberação do BNZ de acordo com o pH, como foi mostrado nos estudos de dissolução.

Figura 31 – Perfil comparativo da diálise na condição non-sink do sistema BNZ@ZIF-8 em pH's 4,5 e 7,6.



FONTE: Autoria própria

Fica evidente que uma menor porcentagem de fármaco é liberada do sistema e em um intervalo de tempo muito maior quando comparado aos ensaios de dissolução. Esse comportamento deve ser explicado pelas interações entre o fármaco que está intimamente ligado à rede de coordenação da ZIF-8 ainda que apenas fisicamente adsorvido. Ainda cabe salientar que, ao passo que o fármaco se dissocia e se difunde, um novo equilíbrio de sorção e dessorção do fármaco pode ser atingido.

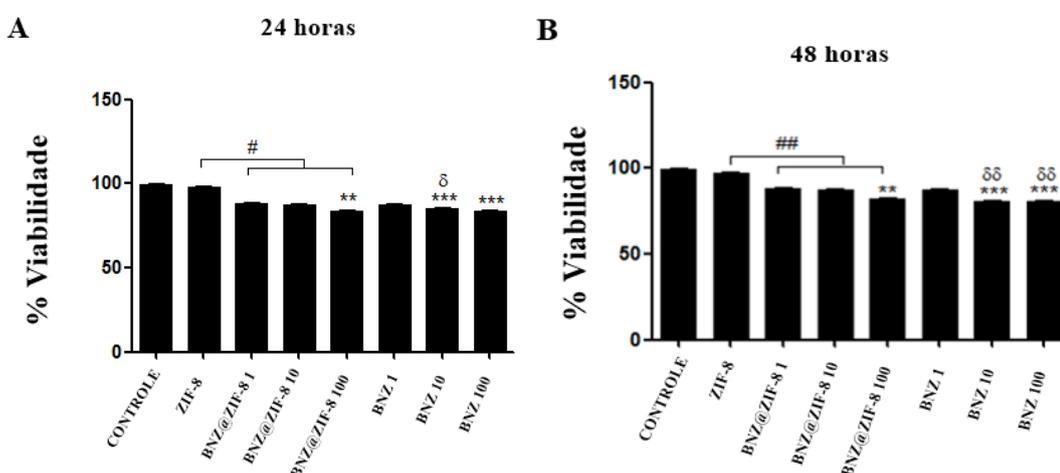
Assim, é comum que haja uma liberação mais rápida, proveniente do fármaco que não estava ligado à ZIF-8 – ou que estava ligado de forma fraca –, seguido de um prolongamento de liberação do BNZ devido equilíbrio de sorção/dessorção. Outro fator a ser considerado é que, na dissolução, os compostos ficam expostos a uma maior quantidade de meio de dissolução e, na diálise, ficam encerrados pela membrana, esta última servindo de barreira limitante à difusão do fármaco, ZIF-8 e até mesmo da água. Desta forma, para ser quantificado no meio externo, o fármaco precisa se difundir não somente pela rede da ZIF-8, mas também pela membrana de diálise.

5.3 Avaliação *in vitro* da viabilidade celular através do método MTT

Foi verificada a baixa atividade citotóxica dos materiais. Mesmo com as maiores concentrações testadas ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), todas as amostras induziram baixos níveis de morte celular (viabilidade $> 80\%$) por um período de 24 horas (figura 32.A). Isoladamente, após 24 horas, a ZIF-8 ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mostrou baixo potencial citotóxico (viabilidade de $98,2\%$) em relação ao controle ($99,6\%$). O BNZ mostrou viabilidade variando entre $83,9$ a $87,6\%$. Para os sistemas BNZ@ZIF-8, os valores de viabilidade celular foram de $88,6\%$, $87,7\%$ e 84% ; para as doses de 1 , 10 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos testado e controle ($** p < 0,05$, $*** p < 0,001$), e uma diferença significativa entre a atividade citotóxica da ZIF-8 isolada e quando combinada nos sistemas ($\# p < 0,05$). Além disso, houve diferença entre o sistema a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando comparado com o fármaco isolado na mesma dose ($\delta p < 0,05$).

Após 48 horas de tratamento (Figura 32.B), a viabilidade das células tratadas apenas com ZIF-8 manteve-se elevada ($97,3\%$) e a atividade do BNZ variou de 80 a 87% . No sistema, os valores foram de $88,5\%$, $87,7\%$ e $82,4\%$, para 1 , 10 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos testado e controle ($** p < 0,05$, $*** p < 0,001$), e uma diferença significativa entre a atividade da ZIF-8 isolada quando comparada ao sistema ($\#\# p < 0,05$). Além disso, observou-se diferença entre o sistema BNZ@ZIF-8 a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando comparado com o BNZ isolado na mesma concentração, bem como na atividade do sistema a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando comparado com o BNZ isolado nesta mesma concentração ($\delta\delta p < 0,05$).

Figura 32 – Efeitos do BNZ, ZIF-8 e BNZ@ZIF-8 em diferentes concentrações na viabilidade de células humanas (PBMC) de acordo com o ensaio MTT em tempo de exposição: A) 24 horas e B) 48 horas.



FONTE: Autoria Própria

Desta forma, fica evidente a baixa atividade citotóxica dos materiais. Mesmo após 48 horas de tratamento, todas as concentrações testadas não apresentaram efeito tóxico significativo (Tabela 19), nem efeito significativo sobre a viabilidade celular. O fato do sistema ser menos tóxico que o fármaco isolado pode ser explicado pela liberação lenta do mesmo.

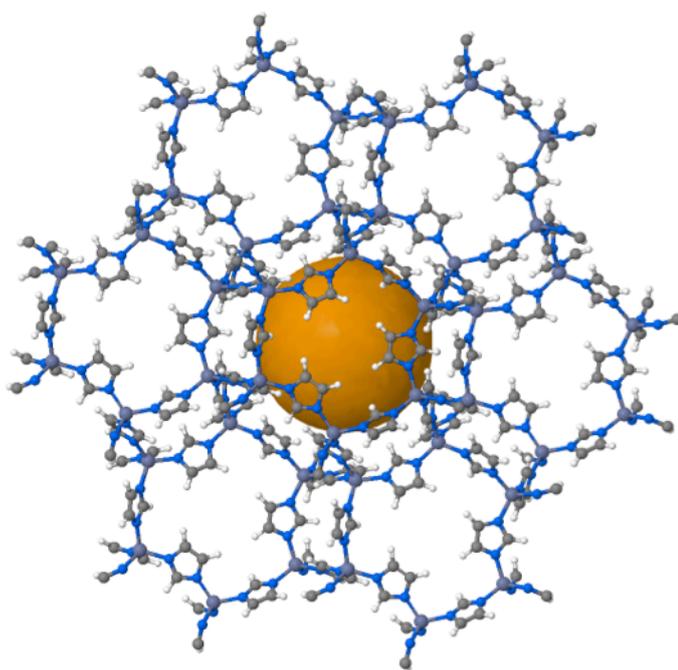
Tabela 19 – Valores (em porcentagem) da viabilidade celular obtida pelo método MTT.

Tempo	Controle	BNZ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	BNZ (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	BNZ (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ZIF-8 (150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	BNZ@ZIF-8 (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	BNZ@ZIF-8 (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	BNZ@ZIF-8 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
24 horas	99,6	87,6	85,0	83,9	98,2	88,6	87,7	84,0
48 horas	99,6	87,0	81,0	80,0	97,3	88,5	87,7	82,4

FONTE: Autoria própria

A ZIF-8 e o BNZ@ZIF-8 não apresentaram citotoxicidade significativa nas células testadas através do método do MTT. A ZIF-8, inclusive, demonstrou-se praticamente inerte, evidenciando o fato de que ela pode ser um adjuvante farmacêutico como carreador. Estes resultados encontram-se em conformidade com os dados apresentados por Alves (2013) e Ren e colaboradores (2014). Segundo estes últimos pesquisadores, a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a MOF's à base de zinco apresentam boa viabilidade, no entanto, exibem algumas alterações morfológicas celulares e, por vezes, desregulação de síntese proteica. Neste sentido, novos estudos através de microscopia confocal e citometria de fluxo utilizando BNZ@ZIF-8 deverão ser requeridos. Já a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ os pesquisadores evidenciaram a baixa viabilidade celular.

Por fim, as análises realizadas indicam que o sistema BNZ@ZIF-8 pode ser utilizado como IFA antichagásico em formas farmacêuticas, uma vez que, nas concentrações testadas, demonstrou-se seguro devido baixo potencial citotóxico nos tempos e concentrações testadas. No entanto, mais testes serão necessários a fim de avaliar a citotoxicidade *in vitro* (de maneira subcrônica e crônica) e *in vivo* destes materiais.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

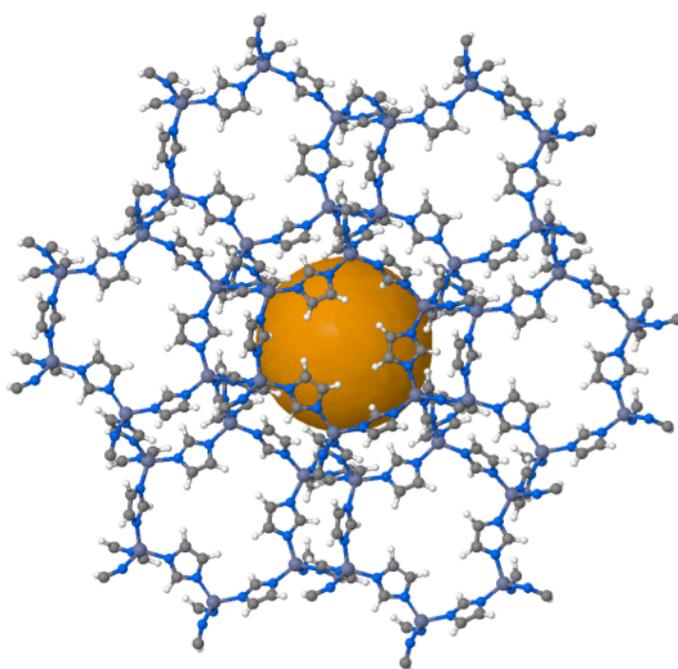
Em virtude de todos os argumentos demonstrados no presente trabalho, foi possível inferir que:

- ✓ Foi obtido um DDS com EI%=38% através da otimização de um método de obtenção *ex situ*, variando proporções molares, dias de agitação e solventes de solubilização. Desta forma, o sistema BNZ:ZIF-8 em proporção molar 1:1 obtido em acetona (denominado BNZ@ZIF-8) foi selecionado como melhor DDS desenvolvido;
- ✓ As técnicas de caracterização utilizadas no presente trabalho possibilitaram a corroboração da formação do sistema, principalmente devido às comparações realizadas com os materiais isolados, a MF e o sistema obtido em água. Este estudo serve como uma etapa inicial para os estudos de pré-formulação, visto que todas as metodologias evidenciaram a formação de um DDS capaz de reduzir o tamanho do cristalito do fármaco;
- ✓ Os ensaios de dissolução *in vitro*, sob condições *sink* e *non-sink*, demonstraram que em pH 4,5 a estrutura da ZIF-8 se dissocia rapidamente, liberando uma grande quantidade de fármaco em um curto intervalo de tempo. Já em pH 7,6, a liberação de BNZ a partir do BNZ@ZIF-8 se dá de forma prolongada. Estes resultados são melhor evidenciados na condição *non-sink*, pois apresenta lenta liberação e redução do efeito *burst*;
- ✓ Houve, de fato, a modulação da liberação do fármaco que pôde ser comprovada através de métodos modelo-dependente e modelo-independente. Mediante o ajuste dos perfis de dissolução foi possível sugerir o mecanismo de liberação do fármaco a partir do sistema BNZ@ZIF-8, o qual ocorre de maneira diferente a depender do pH testado, corroborando a ideia de modulação da liberação;
- ✓ O ensaio de diálise proporcionou uma estimativa da liberação seguida de permeação do BNZ. Resultados semelhantes aos da dissolução foram evidenciados no tocante da modulação pH-dependente. Em pH 4,5 foi observada uma liberação mais rápida do BNZ a partir do sistema em comparação ao pH 7,6. Além disso, a concentração de BNZ de ambas as situações foi menor que a do BNZ isolado e que a liberação se deu de forma prolongada, apresentando-se sem oscilações de concentrações e sem efeito *burst* demonstrados pelo fármaco;

- ✓ O sistema BNZ:ZIF-8 em proporção molar 1:1 obtido em acetona apresentou baixa toxicidade até a concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando menor efeito sobre a viabilidade celular que o próprio fármaco isolado;
- ✓ Teve-se, então, êxito na obtenção de um DDS pH-dependente. Enquanto permanece na corrente sanguínea – onde o pH varia entre 7,35-7,45 – o BNZ@ZIF-8 pode liberar controladamente o fármaco, por difusão seguido de erosão/intumescimento da rede polimérica da ZIF-8. Quando em contato com as células infectadas pelo *T. cruzi* – cujo pH é próximo a 5 – o sistema pode libera o BNZ mais rapidamente. Fica evidente que se teve o desenvolvimento de um sistema carreador do BNZ capaz de vetorizá-lo às células infectadas pelo parasita, promovendo uma melhora da sua biodisponibilidade, aumentando a adesão de um tratamento mais seguro e alternativo para a doença de Chagas;

Diante dos resultados obtidos e da premissa da obtenção de um produto farmacêutico destinado ao tratamento alternativo da doença de Chagas, tem-se como perspectivas do presente trabalho:

- ✓ Realizar o estudo de diálise em condições *non-sink* a fim de correlacionar os resultados obtidos no estudo de dissolução *in vitro*;
- ✓ Investigar, *in vitro*, a dinâmica de absorção e interação do sistema BNZ@ZIF-8 através de microscopia confocal e citometria de fluxo;
- ✓ Realizar estudo de *docking* a nível molecular para caracterizar a interação entre o BNZ e a ZIF-8, o que pode contribuir para a análise do fato da alteração do perfil térmico evidenciado pela TG do BNZ@ZIF-8;
- ✓ Avaliar a farmacocinética *in vivo* do sistema BNZ@ZIF-8 em parceria com a Prof^a. Dr^a. Rosângela Perccinini da UNESP – Araraquara.
- ✓ Realizar a obtenção tecnológica de uma forma farmacêutica à base do DDS para o tratamento alternativo da doença de Chagas, seguido dos controles de qualidade pertinentes;



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADIBKIA, K.; ALAEI-BEIRAMI, M.; BARZEGAR-JALALI, M. Evaluation and optimization of factors affecting novel diclofenac sodium- eudragit RS100 nanoparticles. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 12, p. 941–947, 2012.

AGUILERA-SIGALAT, J.; BRADSHAW, D. Synthesis and applications of metal-organic framework–quantum dot (QD@MOF) composites. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 307, p. 267–291, 2016.

ALEXEEV, Y.E. et al. Coordination motifs in modern supramolecular chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 794-831, 2010.

ALTCHEH, J. et al. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. **Pediatrics**, v. 127, n. 1, p. e212–e218, 2011.

ALVES, I. B. V. **Metal-Organic Frameworks (MOFs): alternativa inteligente para carregamento 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.

AN, J.; GEIB, S. J.; ROSI, N. L. Cation-triggered drug release from a porous zinc-adeninate metal-organic framework. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 24, p. 8376–7, 2009.

ANDREAUS, Jürgen et al . Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 33, n. 4, p. 929-937, 2010 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000400031&lng=en&nrm=iso>. access on 08 Mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000400031>.

ANWEKAR, H.; PATEL, S.; SINGHAI, A K. Liposome- as drug carriers. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 2, n. 7, p. 945–951, 2011.

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.

ARORA, G. et al. Formulation and evaluation of controlled release matrix mucoadhesive tablets of domperidone using Salvia plebeian gum. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 3, p. 163–9, 2011.

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*, 2007.

BANERJEE, R. et al. Control of pore size and functionality in isorecticular zeolitic imidazolate frameworks and their carbon dioxide selective capture properties. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 11, p. 3875–3877, 2009.

BIDONE, J. et al. Preparation and characterization of ibuprofen-loaded microspheres consisting of poly(3-hydroxybutyrate) and methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactide) blends or poly(3-hydroxybutyrate) and gelatin composites for controlled drug release. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 588–593, 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.

BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Cad. da Esc. de Saúde**, v. 1, n. 15, p. 42-51, 2016.

BLACHNIK, R.; SIETHOFF, C. Thermoanalytical and X-ray study of some alkylammonium tetrachlorozincates. **Thermochimica Acta**, v. 278, n. 1-2, p. 39–47, 1996.

BREWER, G. J. et al. Subclinical zinc deficiency in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **American journal of Alzheimer's disease and other dementias**, v. 25, n. 7, p. 572–575, 2010.

BROWN, C. K. et al. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, n. December 2004, p. 56–65, 2004.

CACHO-BAILO, F. et al. ZIF-8 continuous membrane on porous polysulfone for hydrogen separation. **Journal of Membrane Science**, v. 464, p. 119–126, 2014.

CAMPOS, M. C. O. et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 17–19, 2014.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.

CAPASSO, M. et al. Zinc dyshomeostasis: a key modulator of neuronal injury. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 8, n. 2, p. 93–108; discussion 209–15, 2005.

CARMIGNAN, F.; BIDONE, J.; LEMOS-SENNA, E. **Emprego dos polihidroxialcanoatos em sistemas de liberação controlada de fármacos** *Latin American Journal of Pharmacy*, 2008.

CARRILERO, B. et al. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. **Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia**, v. 24, n. 3, p. 123–6, 2011.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.

CESTARI, I. et al. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 4, p. 1942–52, 2012.

CHERNY, R. A. et al. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. **Neuron**, v. 30, n. 3, p. 665–676, 2001.

COOK, T. R. et al. Metal-organic frameworks and self-assembled supramolecular coordination complexes: comparing and contrasting the design, synthesis, and functionality of metal-organic materials. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 1, p. 734-777.

CORNIOLA, R. S. et al. Zinc deficiency impairs neuronal precursor cell proliferation and induces apoptosis via p53-mediated mechanisms. **Brain Research**, v. 1237, p. 52–61, 2008.

COSTA, S. P. M. et al. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical

entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, v. 562, p. 29–34, 2013.

COSTA, S. P. M. **Obtenção de sistemas poliméricos microparticulados para o aumento da velocidade de dissolução do efavirenz na terapia anti-HIV**. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica), Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 2016. 150p.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–82, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6–S7, 2010.

CUFFINI, S. L. et al. Physicochemical characterization of deflazacort: Thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, n. 3, 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. 663–701, 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, L. C. et al. A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de Chagas e Leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 2, p. 105–124, 2011.

CUNHA-FILHO, M. et al. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. v. 49, n. 4, p. 279–283, 2012.

DA SILVA, A. L. M. et al. Desenvolvimento de método analítico por clae em comprimidos de benznidazol para a doença de chagas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163–1166, 2007.

DANTAS RAMOS, A. L.; TANASE, S.; ROTHENBERG, G. Redes metalorgânicas e suas aplicações em catálise. **Quimica Nova**, v. 37, n. 1, p. 123–133, 2014.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–23, 2010.

DE BRUM, T. F. et al. Equivalência farmacêutica e estudo comparativo dos perfis de dissolução de medicamentos genéricos contendo paracetamol. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 373–378, 2012.

DE LYRA, M. A. M. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784–793, 2007.

DE MELO, C. M. et al. A compatibility study of the prototype epiisopiloturine and pharmaceutical excipients aiming at the attainment of solid pharmaceutical forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 689–697, 2014.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.

DELLA ROCCA, J.; LIU, D.; LIN, W. Nanoscale metal-organic frameworks for biomedical imaging and drug delivery. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 957–968, 2011.

DENG, H. et al. Multiple functional groups of varying ratios in metal-organic frameworks. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 846–850, 2010.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R.; YASUDA, M. A. S. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 123–125, 2014.

DIAS, J.; COURA, J. **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral**. [s.l: s.n.]. v. 30

DIAS, L. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

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.

DINUNZIO, J. C. et al. Applications of Kinetics Dispersing for the production of plasticizer free amorphous solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 179–187, 2010.

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

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. Novo Tratamento para Crianças com a Doença de Chagas Aprovado pela ANVISA. Rio de Janeiro, Recife, Brasil e Genebra, Suíça, 2011. Disponível em: < <http://www.dndi.org/media-centre/press-releases/1018-benzonidazolped.html> >. Acesso em: 22/09/15.

EDGAR, M. et al. Solid-state transformations of zinc 1,4-benzenedicarboxylates mediated by hydrogen-bond-forming molecules. **Chemistry - A European Journal**, v. 7, n. 23, p. 5168–5175, 2001.

FAN, X. et al. Highly porous ZIF-8 nanocrystals prepared by a surfactant mediated method in aqueous solution with enhanced adsorption kinetics. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 17, p. 14994–14999, 2014.

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. 103–113, 2015.

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

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.

FERREIRA, A. M. C. **Construindo arcabouços supramoleculares de interesse bioinorgânico**. In: ALVES, W. A.; BEATRIZ, E. Química Supramolecular e Nanotecnologia - volume 10. São Paulo: Editora Atheneu, 2014

FERRAZ, L. R. **Aplicação do *Quality by Design* no estudo de pré-formulação farmacêutica do sulfato de hidroxicloroquina**. Recife, PE. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

FONSECA-BERZAL, C. et al. Novel solid dispersions of benznidazole: Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 84–91, 2015.

FÜGI, M. A et al. Match-making for posaconazole through systems thinking. **Trends in parasitology**, p. 1–6, 2014.

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.

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

GOMES, T. D. A. et al. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antiretroviral classe II : Efavirenz. v. 36, n. 2, p. 239–249, 2015.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl , p. 115–121, 2009.

HAMMAN, J.; STEENEKAMP, J. Excipients with specialized functions for effective drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 2, p. 219–230, 2012.

HARA, N. et al. Diffusive separation of propylene/propane with ZIF-8 membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 450, p. 215–223, 2014.

HE, L. et al. Carbon nanodots@zeolitic imidazolate framework-8 nanoparticles for simultaneous pH-responsive drug delivery and fluorescence imaging. **CrystEngComm**, v. 16, n. 16, p. 3259, 2014.

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

HINKS, N. J. et al. Metal organic frameworks as NO delivery materials for biological applications. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 129, n. 3, p. 330–334, 2010.

HONORATO, S. B. et al. Novel polymorphs of the anti-Trypanosoma cruzi drug benznidazole. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 118, p. 389–94, 2014.

HORCAJADA, P. et al. Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 36, p. 5974–5978, 2006.

HORCAJADA, P. et al. Synthesis and catalytic properties of MIL-100(Fe), an iron(III) carboxylate with large pores. **Chemical Communications**, n. 27, p. 2820, 2007.

HORCAJADA, P. et al. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. **Nature materials**, v. 9, n. 2, p. 172–178, 2010.

HU, X. et al. Nanostructured mesoporous ZIF-8 / silica composites. 2016.

HUANG, X.; ZHANG, J.; CHEN, X. [Zn(bim)₂] · (H₂O)_{1.67}: A metal-organic open-framework with sodalite topology. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 15, p. 1531–1534, 2003.

HUXFORD, R. C.; DELLA ROCCA, J.; LIN, W. Metal-organic frameworks as potential drug carriers. **Curr Opin Chem Biol**, v. 14, n. 2, p. 262–268, 2010.

IMAZ, I. et al. Coordination polymer particles as potential drug delivery systems. **Chemical communications**, v. 46, p. 4737–4739, 2010.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC recommendations 2005, N. G. Connelly, T. Damhus, R. M. Hartshorn, A. T. Hutton, International Union of Pure and Applied http://www.iupac.org/nc/home/publications/iupac-books/books-db/bookdetails.html?tx_wfqbe_pi1%5Bbookid%5D=5Chemistry by The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC.

Coordination polymers and metal organic frameworks: terminology and nomenclature guidelines. Disponível em: <<http://www.iza-online.org/MOF/MOFforIZA.pdf>> Acesso em: 5 abril 2016.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. J. **Drug dissolution: Significance of physicochemical properties and physiological conditions** *Drug Discovery Today*, 2013.

JANIGOVA, I.; LACÍK, I.; CHODÁK, I. Thermal degradation of plasticized poly(3-hydroxybutyrate) investigated by DSC. **Polymer Degradation and Stability**, v. 77, p. 35–4; 2002.

JEONG, Y. S. et al. Cellular uptake, cytotoxicity, and ROS generation with silica/conducting polymer core/shell nanospheres. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7217–7225, 2011.

JENSEN, W. B. **The Lewis acid-base concepts**. New York: Wiley, 1980.

KANG, L. et al. Investigating metal-organic framework as a new pseudo-capacitive material for supercapacitors. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, n. 6, p. 957–961, 2014.

KAO, Y. Y. et al. Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo. **Journal of Molecular Neuroscience**. **Anais**: 2012

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, n. 45, p. 18790–18796, 2012.

KESKIN, S.; SEDA, K.; KIZILEL, S. Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks. **Science**, v. 50, p. 1799–1812, 2010.

KHALID, I. et al. Formulation and in vitro evaluation of mucoadhesive controlled release matrix tablets of flurbiprofen using response surface methodology. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 493–504, 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.

KIDA, K. et al. Formation of high crystalline ZIF-8 in an aqueous solution. **CrystEngComm**, v. 15, n. 9, p. 1794, 2013.

KLOSE, D.; DELPLACE, C.; SIEPMANN, J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 75–82, 2011.

KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25–35, 1983.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of Trypanosoma cruzi and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, ciências, saúde--Manguinhos**, v. 16 Suppl 1, n. December 2008, p. 13–34, 2009.

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 formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 239–243, 2006.

LEE, J.; LI, J.; JAGIELLO, J. Gas sorption properties of microporous metal organic frameworks. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 178, n. 8 SPEC. ISS., p. 2527–2532, 2005.

LEI, J. et al. **Design and sensing applications of metal-organic framework composites**TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2014.

LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M.E; SALOMON, C.J. Effects of benznidazole:cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 62, p. 543– 548, 2013.

LI, H. et al. Establishing microporosity in open metal-organic frameworks: Gas sorption isotherms for Zn(BDC) (BDC = 1,4-benzenedicarboxylate) [28]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 33, p. 8571–8572, 1998.

LIÉDANA, N. et al. CAF@ZIF-8: One-step encapsulation of caffeine in MOF. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, n. 9, p. 5016–5021, 2012.

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

LIN, W.; RIETER, W. J.; TAYLOR, K. M. L. **Modular synthesis of functional nanoscale coordination polymers** *Angewandte Chemie - International Edition*, 2009.

LIU, S. et al. Zeolitic imidazolate framework-8 as a luminescent material for the sensing of metal ions and small molecules. **Journal of Materials 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.

MA, Z.; MOULTON, B. **Recent advances of discrete coordination complexes and coordination polymers in drug delivery** *Coordination Chemistry Reviews*, 2011.

MACHADO, F. S. et al. **Chagas Heart Disease** *Cardiology in Review*, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3275684&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

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 benzimidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology International**, v. 62, p. 79–81, 2013.

MANSUR, H. S. Técnicas de caracterização de Materiais. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**, p. 552, 2007.

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.

MAXIMIANO, F. P. et al. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1714–1719, 2010.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, p. 601–620, 2007.

MCKINLAY, A. C. et al. BioMOFs: metal-organic frameworks for biological and medical applications. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 49, n. 36, p. 6260–6, 2010.

MELO, P. N. et al. Host–guest interactions between benznidazole and beta-cyclodextrin in multicomponent complex systems involving hydrophilic polymers and triethanolamine in aqueous solution. **Journal of Molecular Liquids**. v. 186, p.147–156, 2013.

MICHAEL E AULTON. *Pharmaceutics, The Design and manufacture of medicines*. **Harcourt Publishers Limited, London**, v. 3, p. 175–177, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz. **Doenças Negligenciadas**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: < <http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas> >. Acesso em: 22/09/15.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p.55-63, 1983.

MURCIA, L. et al. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, p. 26–34, 2013.

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.

O'KEEFFE, M. et al. Frameworks for Extended Solids: Geometrical Design Principles. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 152, n. 1, p. 3–20, 2000.

OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. C. DE. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224–1230, 2011.

OLIVEIRA, M. F. . et al. Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, 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.

PAKKUNAINEN, M. et al. Uncertainty in dissolution test of drug release. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 97, n. 1, 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, n. 1-2, p. 110–117, 2014.

PÁPAY, Z. E. et al. Comparative evaluation of the effect of cyclodextrins and pH on aqueous solubility of apigenin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 210–216, 2016.

PAPPARELLO, R. L.; MIR??, E. E.; ZAMARO, J. M. Secondary growth of ZIF-8 films onto 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 of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10186–10191, 2006.

PAVLICA, S.; GEBHARDT, R. Comparison of uptake and neuroprotective potential of seven zinc-salts. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 1, p. 84–93, 2010.

PEIKERT, K. et al. Tuning the nitric oxide release behavior of amino functionalized HKUST-1. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 216, p. 118–126, 2015.

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, n. 2, p. 169–172, 1989.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Chagas disease: The challenge of polyparasitism? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 176–182, 2014.

PÉREZ-MOLINA, J. A et al. Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benznidazole treatment. **Acta tropica**, v. 127, n. 2, p. 101–4, 2013.

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, n. 11, p. 1294–1300, 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. 12, 2007.

PHAN, A. et al. Synthesis, structure, and carbon dioxide capture properties of zeolitic imidazolate frameworks. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 1, p. 58–67, 2010.

PINAZO, M.-J. et al. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 390–5, 2013.

POLAK, A.; RICHLE, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 72, n. 1, p. 45–54, 1978.

PONTES, V. et al. **Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceara** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2010. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n2/15.pdf>>
<<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=2010358165>>

QURESHI, S. A. Choice of rotation speed (rpm) for bio-relevant drug dissolution testing using a crescent-shaped spindle. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 3, p. 271–275, 2004.

QURESHI, S. A.; MCGILVERAY, I. J. Typical variability in drug dissolution testing: Study with USP and FDA calibrator tablets and a marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 249–258, 1999.

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, n. 4, p. 291–297, 2003.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RECIFE, A. C. D. **Amido retrogradado como excipiente de comprimidos para liberação controlada de fármacos: obtenção e caracterização [Dissertação de Mestrado]**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, 2013.

REN, F. et al. Toxic effect of zinc nanoscale metal-organic frameworks on rat pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. **Journal of Hazardous Materials**, v. 271, p. 283–291, 2014a.

REN, H. et al. Polyacrylic acid@zeolitic imidazolate framework-8 nanoparticles with ultrahigh drug loading capability for pH-sensitive drug release. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 50, n. 8, p. 1000–2, 2014b.

RHODES, M. **Introduction to Particle Technology**. [s.l.: s.n.]. v. 7

RIBEIRO, L.; CARVALHO, R. A.; FERREIRA D. C.; VEIGA, F. J. Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 1-13, 2005.

RIBEIRO, A. B.; BOTELHO, E. C.; COSTA, M. L. A Estudo da Cinética de Decomposição de Compósitos Nanoestruturados de Poli (Sulfeto de Fenileno) Reforçados A com Nanotubos de Carbono. v. 24, p. 720–725, 2014.

RIBEIRO, A. L. et al. **Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy** *Nature Reviews Cardiology*, 2012.

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.

ROCCA, J. DELLA; LIN, W. **Nanoscale metal-organic frameworks: Magnetic resonance imaging contrast agents and beyond** *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010.

p', M. O. et al. Metal organic frameworks for drug delivery and environmental remediation: A molecular docking approach. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 112, n. 20, p. 3346–3355, 2012.

RODRIGUES, I. R. **Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas a Base de Quitosona 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.

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.

ROSE, M. et al. MOF processing by electrospinning for functional textiles. **Advanced Engineering Materials**, v. 13, n. 4, p. 356–360, 2011.

ROSSEINSKY, M. J. **Recent developments in metal-organic framework chemistry: Design, discovery, permanent porosity and flexibility** *Microporous and Mesoporous Materials*, 2004.

ROWSELL, J. L. C.; YAGHI, O. M. Metal–organic frameworks: a new class of porous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 73, n. 1–2, p. 3–14, 2004.

SANTO, A. H. Tendência da mortalidade relacionada à doença de Chagas , Estado de São Paulo , Brasil , 1985 a 2006 : estudo usando causas múltiplas de morte. **Revista Panamericana de Salud Pública.**, v. 26, n. 4, p. 299–309, 2009.

SANTOS, F. et al. Pesquisa , desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 33, n. 1, p. 37–47, 2012.

SANTOS, F. L. A et al. A study of photostability and compatibility of the anti-chagas drug Benznidazole with pharmaceutical excipients. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 41, n. 1, p. 63–69, 2015.

SATHIGARI, S. K. 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.

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.

SCHEJN, A. et al. Controlling ZIF-8 nano- and microcrystal formation and reactivity through zinc salt variations. **CrystEngComm**, v. 16, n. 21, p. 4493, 2014.

SHAH, S. et al. **Melt extrusion with poorly soluble drugs** *International Journal of Pharmaceutics*, 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.

SHEKUNOV, B. Y. et al. Particle Size Analysis in Pharmaceutics: Principles, Methods and Applications. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 2, p. 203–227, 2007.

SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Rev. patol. trop**, v. 36, n. 2, p. 103–118, 2007.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323–330, 2012.

SOUZA, S. D. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, n. 304757, p. 1–12, 2014.

SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.

SOUZA, W.; CARVALHO, U.; M., T. Active penetration of *Trypanosoma cruzi* into host cells: Historical considerations and current concepts. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JAN, p. 2–4, 2013.

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 Evaluation of soluble non-polymeric adjuvants in the release of nimodipino from controlled release matrice. v. 37, n. 2, p. 122–132, 2008.

STOCK, N.; BISWAS, S. Synthesis of metal-organic frameworks (MOFs): routes to various MOF topologies, morphologies, and composites. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 2, p. 933-969; 2013.

STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. **Methods Mol Biol**, v. 740, p. 1-6, 2011. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_1.

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

SUN, D. D.; JU, T. C. 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, n. 1, p. 149–158, 2012.

SYKUŁA-ZAJĄC, A. et al. Thermal and X-ray analysis of racemic bupivacaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. **Anais...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.

TORANZO, E. G. D. DE et al. Short Communications Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from. **Experientia**, v. 44, p. 880–881, 1988.

TROCHINE, A. et al. *Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benzimidazole. **Experimental Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 33–38, 2014.

VASCONCELOS, I. B. et al. Cytotoxicity and slow release of the anti-cancer drug doxorubicin from ZIF-8. **RSC Advances**, v. 2, n. 25, p. 9437, 2012.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 01, p. 51–64, 2010.

VILLAR, J. C. et al. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic Trypanosoma cruzi infection. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, n. 5, p. CD003463, 2002.

VILLELA, M. M. ET AL. Avaliação de conhecimentos e práticas que adultos e crianças têm acerca da doença de Chagas e seus vetores em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1701–1710, 2009.

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, 2003.

WEBB, P. A.; ORR, C. **Analytical Methods in Fine Particle Technology**. [s.l: s.n.]

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2015a. Disponível em: < http://www.who.int/chagas/home_more/en/ >. Acesso em: 28/09/15.

XING, T. et al. Surfactant-assisted synthesis of ZIF-8 nanocrystals in aqueous solution via microwave irradiation. **CrystEngComm**, v. 16, n. 38, p. 8994–9000, 2014.

XIONG, P. et al. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Materials design and control synthesis of the layered double hydroxide with the desired basal spacing. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 144, p. 11–16, 2015.

YU, B. et al. Self-template synthesis of core-shell ZnO@ZIF-8 nanospheres and the

photocatalysis under UV irradiation. **Materials Letters**, v. 156, p. 50–53, 2015.

ZHANG, H. et al. Stability of ZIF-8 membranes and crystalline powders in water at room temperature. **Journal of Membrane Science**, v. 485, p. 103–111, 2015.

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.

ZHANG, Y. et al. Mechanistic toxicity evaluation of uncoated and PEGylated single-walled carbon nanotubes in neuronal PC12 cells. **ACS Nano**, v. 5, n. 9, p. 7020–7033, 2011.

ZHAO, D. et al. Surface functionalization of porous coordination nanocages via click chemistry and their application in drug delivery. **Advanced Materials**, v. 23, n. 1, p. 90–93, 2011.

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.

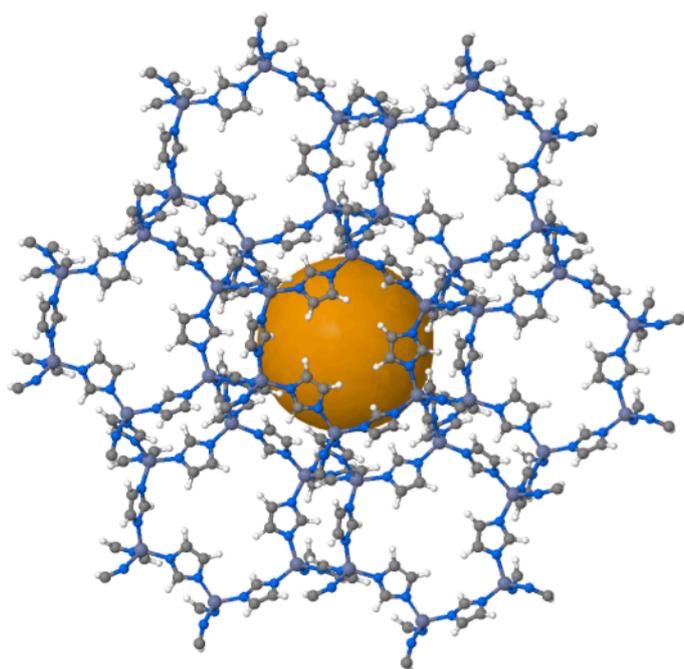
ZHU, M. et al. Catalytic activity of ZIF-8 in the synthesis of styrene carbonate from CO₂ and styrene oxide. **Catalysis Communications**, v. 32, p. 36–40, 2013.

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.

ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44–48, 2011.

ZINGALES, B. et al. Drug discovery for Chagas disease should consider Trypanosoma cruzi strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 828–833, 2014.

ZORNOZA, B. et al. Metal organic framework based mixed matrix membranes: An increasingly important field of research with a large application potential. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 166, p. 67–78, 2013.



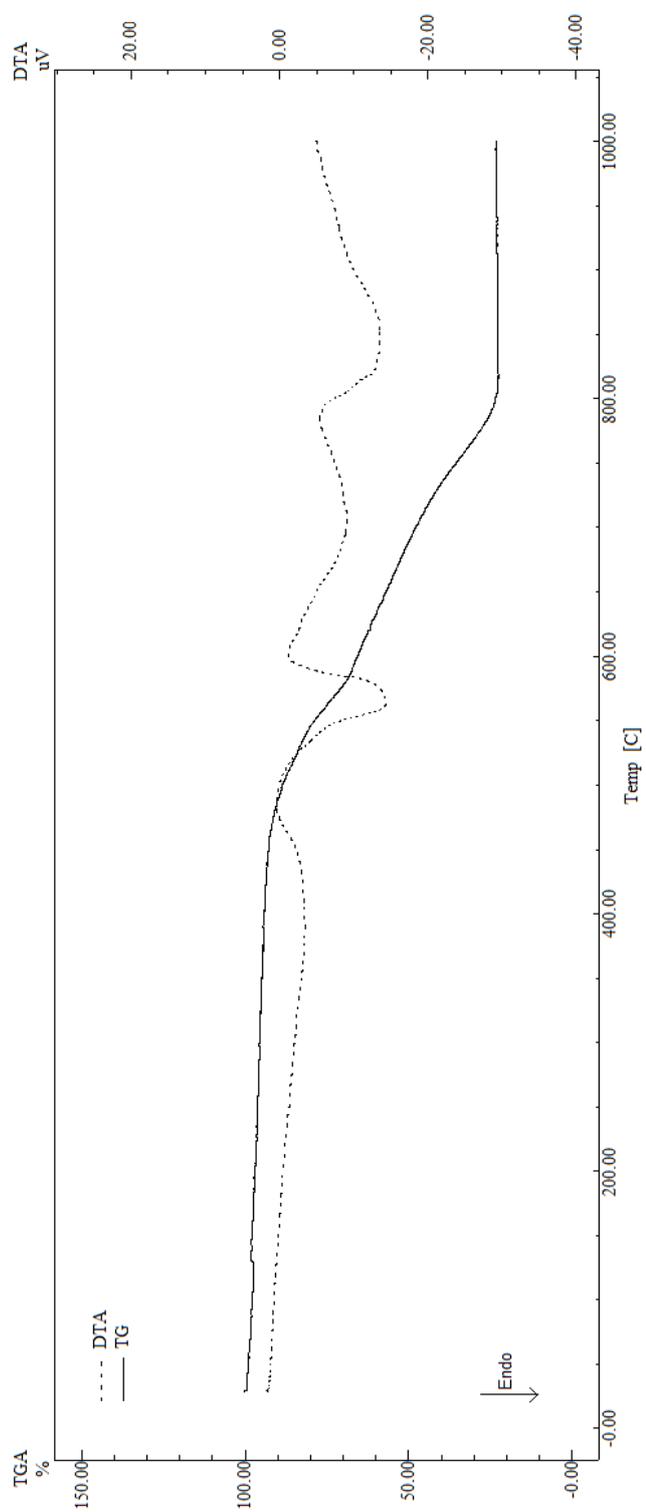
APÊNDICES

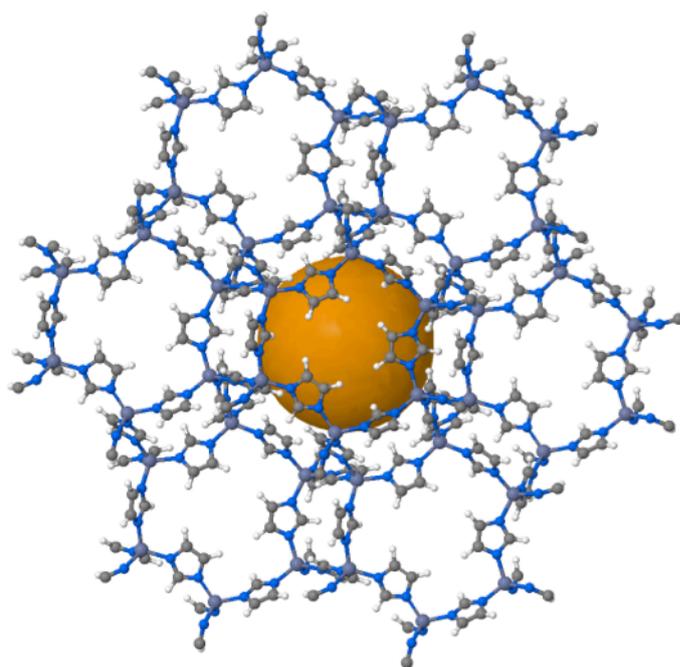
APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva TG/DTA da ZIF-8

APÊNDICE B – Depósito de pedido de patente intitulada: “FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL E MOF’S PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMAS *DRUG DELIVERY*”

APÊNDICE A – Curva TG/DTA da ZIF-8





ANEXOS

ANEXOS

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

ANEXO B – Prêmio de melhor trabalho, intitulado: “DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE OBTENÇÃO DE *DRUG DELIVERY SYSTEM* À BASE DE BNZ E ZIF-8 PARA O TRATAMENTO ALTERNATIVO DA DOENÇA DE CHAGAS”, apresentado no I Congresso Nacional de Farmácia e Biomedicina (Recife – PE)

ANEXO C - Prêmio de melhor resumo (modalidade oral), intitulado: “CARACTERIZAÇÃO POR MICROCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *DRUG DELIVERY SYSTEM* À BASE DE BNZ E ZIF-8”, apresentado no XV Jornada de Iniciação Científica (JONIC 2016) (Recife – PE)

ANEXO D – Comprovante de submissão de artigo original submetido à PLOS One[®] *Journal*, intitulado: “Kinetics analysis of thermally stimulated processes of the antichagasic agent Benznidazole” (submissão: 27 de dezembro de 2016).

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

CERTIFICADO DE ANÁLISE	Controle de Qualidade	Código: 302400001		
		Rev.: 00	Pág 1 / 1	
	BENZNIDAZOL	Lote nº: 301045	Referência: Hoffmann La Roche	
		Data de Fabricação: JANEIRO/2014	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	. 315 nm	. 313 – 317 nm
Å (1%, 1 cm)	. 286,2	. 286 – 304
λ mínimo	. 265 nm	. 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	. <0,1%	. Máximo 0,1%
N-benzil-2-cloroacetamida	. <0,1%	. Máximo 0,1%
Impureza desconhecida	. <2	. Máximo 2 impurezas
Total de imp. Desconhecida	. <0,1%	. Máximo 0,1 %
Soma total de impurezas	. <0,1%	. Máximo 0,3%
. Teor (base seca)	. 100,8%	. 98,5 – 101,5%
. Granulometria		
Através da peneira nº120 USP	. 93%	. Mínimo 85%
Partículas estranhas	. Ausente	. 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 nº de análise 01/13-0125
 Rua Dezessete, nº 200 – Distrito Industrial de Duque de Caxias – Xerém – D. Caxias RJ
 Cep: 25250-612 Tel.: + 55 21 3651-7300

ANEXO B – Prêmio de melhor trabalho, intitulado: “DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE OBTENÇÃO DE *DRUG DELIVERY SYSTEM* À BASE DE BNZ E ZIF-8 PARA O TRATAMENTO ALTERNATIVO DA DOENÇA DE CHAGAS”, apresentado no I Congresso Nacional de Farmácia e Biomedicina (Recife – PE)



ANEXO C - Prêmio de melhor resumo (modalidade oral), intitulado: “**CARACTERIZAÇÃO POR MICROCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE DRUG DELIVERY SYSTEM DRUG DELIVERY SYSTEM À BASE DE BNZ E ZIF-8**”, apresentado no XV Jornada de Iniciação Científica (JONIC 2016) (Recife – PE)

CERTIFICADO

A Faculdade Estácio do Recife confere certificado aos autores **Aline Silva Ferreira, Rodrigo Silva Oliveira, Leslie Raphael de Moura Ferraz, Debora Dolores Souza da Silva Nascimento, Alinne Élide Gonçalves Alves, Larissa Araújo Rolim, Pedro José Rolim Neto - JONIC**, com a apresentação do resumo intitulado “**Caracterização por microscopia Eletrônica de Varredura de DRUG DELIVERY SYSTEM a base de BNZ E ZIF-8**” na modalidade comunicação oral. O qual foi Premiado Como melhor Resumo. A Jornada foi realizada nos dias 22 de novembro de 2016.

Recife, 22 de novembro de 2016.



Magaly Lyra
Coordenação de Pesquisa e Extensão
Estácio Recife



Estácio

ANEXO D – Artigo científico submetido à PLOS One® Journal, intitulado: “Kinetics analysis of thermally stimulated processes of the antichagasic agent Benznidazole”

PLOS ONE
**Kinetics analysis of thermally stimulated processes of the antichagasic agent
 benznidazole**
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Kinetics analysis of thermally stimulated processes of the antichagasic agent benznidazole
Short Title:	Kinetic Analysis of benznidazole
Corresponding Author:	Paulo Cesar Dantas Silva, Ph.D. Universidade Federal de Pernambuco Recife, Pernambuco BRAZIL
Keywords:	Kinetic model; Non-isothermal model; Isothermal model; Isoconversional model; Benznidazole
Abstract:	Aiming to become a pharmaceutical product, it is necessary for a drug to evaluate the safety and quality requirements established by the regulatory agency. A robust pre-formulation study is essential to the dosage forms development. Thermal analysis is one of the methods used in the characterization study, which incorporates several analytical techniques, including thermogravimetry, a widely used technique that is useful to analyze the thermal behavior of a drug. This technique is capable of to determine the kinetic parameters of the degradation reactions and thereby estimate the shelf-life of drugs based on the obtained data. The present work aimed to evaluate the kinetic parameters of the degradation Benznidazole (BNZ), and the kinetic studies of thermally stimulated processes through non-isothermal and isothermal methods. The non-isothermal parameter was performed by Flynn-Wall-Ozawa method. For the isothermal model was applied the Arrhenius equation in order to determine the kinetic parameters and to predict the estimated shelf-life. The results showed that the kinetics degradation of BNZ, when under isothermal conditions, follows reaction order 1 ($R^2 = 0,9740$). By Arrhenius equation it was possible to estimate the shelf-life of the BNZ in about 1.691,854 days (56,395 months). The values obtained for the kinetic parameter activation energy of BNZ showed excellent correlation between the isothermal and non-isothermal studies, indicating that the thermal decomposition of the active pharmaceutical ingredient is not influenced by concurrent processes and corroborating the applicability of kinetic methods.
Order of Authors:	Leslie Raphael de Moura Ferraz Cristovão Rodrigues Silva Alinne Élide Gonçalves Alves Paulo César Dantas da Silva, Ph.D. Debora Dolores Souza da Silva Nascimento Salvana Priscylla Manso Costa Isabela Araújo e Mariz Severino Alves Junior Larissa Araújo Rolim Pedro José Rolim-Neto
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	The author(s) received no specific funding for this work