



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP

ESCOLA DE FARMÁCIA - EFAR



JULIANA RIBEIRO REYNALDO

**LIBERAÇÃO CONTROLADA E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA
DO FÁRMACO CETOCONAZOL
INCORPORADO EM DIFERENTES MATRIZES POLIMÉRICAS DE
PMMA-G-PEG 4000**

OURO PRETO - MG

2022

JULIANA RIBEIRO REYNALDO

Liberação controlada e Avaliação Antifúngica do fármaco cetoconazol
incorporado em diferentes matrizes poliméricas de PMMA-g-PEG 4000

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Farmácia da Universidade Federal de
Ouro Preto como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Martins
Rebello Dos Santos

OURO PRETO – MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R459l Reynaldo, Juliana Ribeiro.

Liberação controlada e avaliação antifúngica do fármaco cetoconazol incorporado em diferentes matrizes poliméricas de pmma-g-peg 4000. [manuscrito] / Juliana Ribeiro Reynaldo. - 2022. 43 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Martins Rebello Santos. Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Liberação controlada de fármacos. 2. Viabilidade Celular. 3. Atividade antifúngica. 4. Copolímeros. I. Santos, Viviane Martins Rebello. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.32

Bibliotecário(a) Responsável: Angela Maria Raimundo - SIAPE: 1.644.803



FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Ribeiro Reynaldo

Liberção Controlada e Avaliação Antifúngica do fármaco cetoconazol incorporado em diferentes matrizes poliméricas de PMMA-G-PEG 4000

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

Aprovada em 12 de janeiro de 2022

Membros da banca

[Doutorado] - Viviane Martins Rebello dos Santos - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
[Graduada em Farmácia] - Maria Luiza Schaefer Azevedo - Universidade Federal de Ouro Preto
[Doutorado] - Isabela Neves de Almeida - Universidade Federal de Ouro Preto

Viviane Martins Rebello dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 12/01/2022



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Martins Rebello dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/01/2022, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0267788** e o código CRC **34D4DD04**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Simone e Claudiney, por sempre estarem comigo e mostrarem qual o melhor caminho a seguir e por sempre me fazerem acreditar que eu sou capaz de grandes coisas e que eu só preciso saber o que eu quero e ter força de vontade a cada dia para chegar onde eu quero. Além disso, muito do que conquistei até hoje eu devo a eles, porque foram os primeiros a apostarem em mim antes mesmo que pudesse.

Agradeço também a minha família por serem muito cuidadosos e estarem sempre ali pra tudo que eu precisei, dando apoio, sendo exemplos, e torcendo por mim, em especial a minha avó que é um exemplo de ser humano e cuidou de mim desde de pequena e é a minha segunda mãe.

Agradeço aos meus amigos que vibraram comigo em cada conquista, em especial aos que trilharam esse caminho difícil mais muito gratificante da vida acadêmica, Adailton, por estar comigo desde do meu primeiro dia da universidade e Sabrina, espero que seja da universidade pra vida.

Aos meus amigos de laboratório Lucas, Ayrton e Maria Luiza, pelo compartilhamento de conhecimento, apoio nas análises e tornarem o ambiente de pesquisa um lugar mais leve.

A minha orientadora Viviane, que me ensinou tanto, conhecimento que levarei pro resto da vida, pela confiança, pela oportunidade, pelo incentivo a participar de congressos e pelo artigo publicado que é algo que tenho com muito orgulho e gratidão.

Por fim, ao Luan, uma pessoa especial que me apoiou e ajudou a tomar decisões importantes no fim da minha graduação e que tornou possível a finalização desse estudo.

RESUMO

A utilização de polímeros na indústria farmacêutica é uma resposta inovadora de administração de medicamentos, principalmente, aqueles que possuem uma elevada toxicidade, o que pode ocorrer por consequência de uma dose elevada ou de uma posologia que não seja prática ao dia a dia. Isso pode ser resolvido com a liberação controlada, que ocorre com os fármacos incorporados aos polímeros ou copolímeros, liberando o fármaco de forma com que ele alcance a faixa terapêutica, e possibilitando que o fármaco atinja seu local de ação em concentrações apropriadas. O copolímero usado nesse estudo, é o copolímero PMMA-g-PEG 4000, que é formado por dois monômeros diferentes. O PMMA-g-PEG 4000 foi escolhido por apresentar boa solubilidade, não é tóxico, não abrasivo, hidrofílico pela presença do PEG em sua estrutura e de fácil processamento. Com o copolímero PMMA-g-PEG 4000 incorporado ao fármaco cetoconazol na sua cadeia polimérica, é possível obter uma boa liberação controlada e isso se deve as modificações que são feitas nas cadeias poliméricas que iram permitir que o fármaco se incorpore de formas diferentes em cada tipo de modificação, refletindo posteriormente em sua liberação. Por meio da liberação controlada, consegue-se manter uma administração menos frequente do medicamento e a dose terapêutica se mantém dentro do nível efetivo do fármaco, ou seja, na faixa terapêutica com diminuição dos efeitos adversos. A primeira etapa deste trabalho, foi a síntese do copolímero PMMA-g-PEG 4000, seguido de modificações nas matrizes poliméricas, que foram feitas através das reações de Halogenação, Acetilação, Alquilação e Esterificação seguida de hidrólise. Após as sínteses, foram feitas as incorporações do fármaco cetoconazol nas diferentes matrizes poliméricas de PMMA-g-PEG 4000. Em seguida, os copolímeros puros e incorporados com cetoconazol foram caracterizados, pela técnica de microscopia de força atômica (AFM). Pela técnica de microscopia na região do infravermelho (IV), podemos detectar as bandas de absorção do fármaco, que são C = C em 1.600, 1.507 e 1.466 cm^{-1} , C-O-C em 1.240 cm^{-1} e 1.258 cm^{-1} em C-N que aparecem nos espectros das diferentes matrizes poliméricas. Após isso, foi realizada a liberação controlada por quatro horas em pH 7,2 que é o pH sanguíneo. Por fim, foi determinada a eficiência da incorporação, a viabilidade celular e a atividade antifúngica.

Palavras-chave: Copolímero. Liberação controlada. viabilidade celular. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

The use of substances in the pharmaceutical industry is an innovative response to the administration of those that have a high toxicity, mainly drugs that can occur as a result of a higher dose or a dosage that is not practical for the day. This can be resolved with a controlled release, which occurs with drugs incorporated into polymers or copolymers, releasing the drug within the therapeutic range, and ensuring that the drug projects its site of action in the appropriate manner. The copolymer used in this study is the PMMA-g-PEG 4000 copolymer, which is formed by two different monomers. PMMA-g-PEG 4000 was chosen because it has good solubility, is non-toxic, non-abrasive, hydrophilic due to the presence of PEG in its structure and is easy to process. With the copolymer PMMA-g-PEG 4000 incorporated into the drug ketoconazole in its polymeric chain, it is possible to obtain a good controlled release and this must be developed as they are done in the polymeric chains that will allow the drug to be incorporated in different ways in each type of byy, later reflecting on its release. Through controlled administration, it is possible to maintain a less frequent medication and a therapeutic dose remains within the effective level of the pharmacy, that is, in the therapeutic range with increased adverse effects. The first step of this work, the synthesis of the copolymer PMMA-g-PE000, was followed by 4 polishing matrices, which were elaborated through the reactions of Halogenation, Acetation, Alkylation followed by hydrolysis. After the syntheses, different incorporations of the drug ketoconazole were made in the polymeric matrices of PMMA-g-PEG 4000. Then, the pure copolymers and those incorporated with ketoconazole were characterized by the atomic force microscopy (AFM) technique. By the technique of microscopy in the infrared (IR) region, we can detect as absorption bands of the drug, which are C = C at 1600, 1507 and 1466 cm^{-1} , COC at 1240 cm^{-1} and 1258 cm^{-1} in CN that in the spectra of the different polymer matrices. After that, the controlled release was performed for four hours at pH 7.2, which is the blood pH. Finally, the efficiency of incorporation and antifungal cell viability were determined.

Keywords: Copolymer. Controlled release. Cell viability. Antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Degradação da matriz polimérica com o fármaco.....	11
Figura 2: Copolímero PMMA-g-PEG 4000 e modificados.....	11
Figura 3: Liberação convencional x liberação controlada.....	12
Figura 4 - Níveis plasmáticos de um fármaco em diferentes sistemas de liberação.....	14
Figura 5: Estrutura do fármaco cetoconazol.....	18
Figura 6: PMMA-g-PEG 4000 incorporados de A – J.....	26
Figura 7: Espectro infravermelho de cetoconazol e PMMA-g-PEG 4000 modificados e incorporados.....	28
Figura 8: AFM de PMMA-g-PEG 4000 modificados antes (a-e) e depois (f-j) do processo de incorporação.....	31
Figura 9: Viabilidade celular com o fármaco cetoconazol e o PMMA-g-PEG 4000 e seus derivados.....	33
Figura 10: Curva padrão do fármaco cetoconazol.....	34
Figura 11: Curva de liberação do cetoconazol a partir de cada copolímero modificado.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Solubilidades em diferentes solventes orgânicos.....	28
Tabela 2: Eficiência prática para incorporação do copolímero com etoconazol.....	29
Tabela 3: Avaliação antifúngica in vitro do PMMA-g-PEG 4000 e derivados.....	32

LISTA DE SIGLAS

SLF: liberação de Fármaco

DDS: *Drug Delivery System*

PEG: polietilenoglicol

PMMA-g-PEG 4000: copolímero

PAm: bisacrilamida, poli(acrilamida)

PVA, PAA: poli (ácido metacrílico)

PMAA: poli (acrilato de butila)

PBA: poli (metacrilato de metila)

PMMA: poli (N-isopropil acrilamida),

PVP: poli(fosfazona),

PLA, PCL: poli (metacrilato de 2-hidroxietila)

HEMA: poli (oligo (óxido de etileno))

POEOMA: monometiléter metacrilato) (POEOMA)

SCB: sistema de Classificação Biofarmacêutica

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

UV/VIS: espectroscopia UV-Visível

MIC: concentração inibitória mínima

PVA: álcool polivinílico

AFM: microscopia de força atômica

RPMI: meio de cultura de células

DMSO: dimetilsulfóxido

SRB: Sulforrodamina B

TRIS: solução tampão

ISO: entidade de padronização e normatização

PMMA-G-PEG 4000 HALOG INCORP CETO: Copolímero halogenado incorporado com cetoconazol

PMMA-G-PEG 4000 ETI INCORP CETO: Copolímero etilado incorporado com cetoconazol

PMMA-G-PEG 4000 HIDROL INCORP CETO: Copolímero hidrolisado incorporado com cetocozol

PMMA-G-PEG 4000 ACET INCORP CETO: Copolímero acetilado incorporado com cetoconazol

PMMA-G-PEG 4000 INCORP CETO: Copolímero incorporado com cetoconazol

1- INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Liberação controlada de fármacos	16
2.2 Polímeros usados na liberação controlada de fármacos.....	19
2.3 Cetoconazol.....	21
2.4 <i>Candida albicans</i>	22
3- JUSTIFICATIVA/ RELEVÂNCIA	24
OBJETIVO GERAL.....	25
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5- METODOLOGIA.....	26
5.1 Síntese do copolímero PMMA-g-PEG4000 e copolímeros PMMA-g-PEG4000 modificados.....	26
5.2 Incorporação do Antifúngico Cetoconazol no copolímero PPMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados	27
5.3 Determinação da eficiência do Cetoconazol incorporado	27
5.4 Teste de solubilidade do fármaco	28
5.5 Determinação da curva padrão	28
5.6 Liberação Controlada do Cetoconazol.....	29
5.6 Análises AFM do copolímero PMMA-G-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados incorporados com cetoconazol	30
5.7 Avaliação antifúngica in vitro	30
5.8 Viabilidade Celular	31
6- RESULTADOS	31
6.1 Sínteses e Incorporação do cetoconazol do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados.	31
6.2 Análises de Infravermelho do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-g-PEG 4000 modificados incorporados com cetoconazol	32
6.3 Testes de solubilidades do fármaco, PMMA-g-PEG, PMMA-g-PEG modificados e incorporados.....	33

6.5 Análises AFM do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-g-PEG4000 modificados s incorporados com cetoconazol.....	36
6.6 Avaliação antifúngica in vitro.....	37
6.7 Viabilidade celular.....	38
6.8 Curva Padrão.....	39
6.9 Liberação Controlada.....	40
7- CONCLUSÃO.....	42
8- REFERÊNCIAS.....	43

1- INTRODUÇÃO

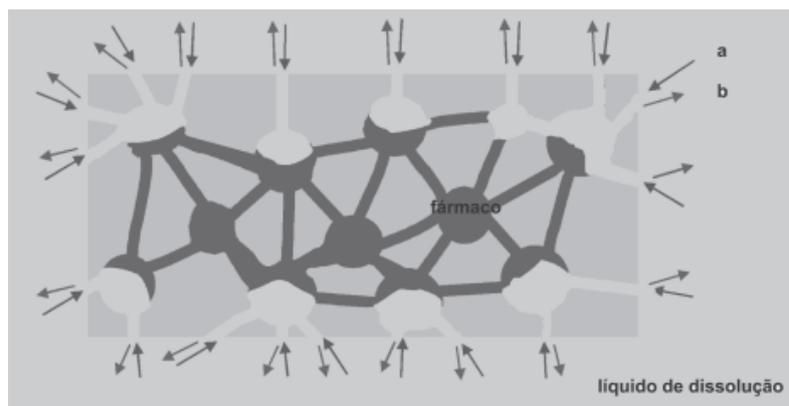
Existem várias vias de administração de fármacos, via parenteral, oral, retal e destacando a via oral, com as formas farmacêuticas, como por exemplo, comprimidos, cápsulas e drágeas, tem-se uma forma de administrar um fármaco mais inovadora é por meio de vetores, que podem ser os polímeros sintéticos que representam uma das classes de materiais mais versáteis que existem, e podem ser usados para armazenar o fármaco e libera-lo aos poucos no organismo para que seja absorvido lentamente.

Esses polímeros trazem como benefício manutenção da dose terapêutica e diminuição significativa dos efeitos adversos. Temos três termos empregados para designar os medicamentos são eles: medicamento tradicional (ou convencional), sistema de liberação de fármacos e sistema de liberação de fármacos de desempenho terapêutico avançado. Por definição, Sistema de Liberação de Fármaco (SLF) ou *Drug Delivery System* (DDS) é um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos. Desta forma, alterações cíclicas na concentração são eliminadas e a disponibilidade biológica do fármaco é aumentada. Também, pode ser conseguida redução da toxicidade, supressão de reações adversas e diminuição do número de doses administradas, diariamente (JANAINA et al, 2010).

Outra vantagem desse sistema de liberação de fármacos por polímeros são os denominados medicamentos problema, ou seja, quanto a sua solubilidade, os que são pouco solúveis ou até mesmo o que são pouco estáveis ou que possui pouca biodisponibilidade quando são liberados fora do seu local de ação. Todas essas questões podem ser sanadas com o uso da incorporação de fármacos nos polímeros.

O modelo de liberação do polímero empregado nesse estudo é o sistema de matriz, nela o fármaco encontra-se disperso no polímero. As matrizes inertes são constituídas por polímeros insolúveis, que originam estruturas porosas nas quais o fármaco está disperso, mantendo a mesma superfície aparente (interface sólido/líquido de dissolução) ao longo de toda a etapa de dissolução. Os comprimidos preparados com polímeros inertes formam sistemas que não se alteram ao longo do trato gastrointestinal, sendo eliminados praticamente intactos. A dissolução do fármaco nas matrizes inertes verifica-se após penetração do líquido de dissolução nos poros do sistema matricial, seguindo-se etapa de difusão lenta do fármaco dissolvido nos canalículos (MARTINS. L.C, 2005).

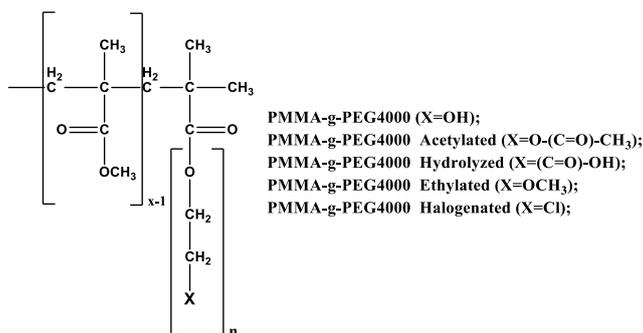
Figura 1: Degradação da matriz polimérica com o fármaco



Fonte: VILLANOVA C. O. J et al, 2010

O polímero a ser empregado nas formulações de liberação controlada de fármacos deve ser quimicamente inerte, ou seja, não apresentar antigenicidade intrínseca; ser preferencialmente biodegradável, livre de impurezas, não se acumular no organismo, apresentar grupos funcionais para ligação química, ou seja, modificações em sua cadeia e, principalmente, manter a atividade original do fármaco liberado até que atinja o local de ação. A combinação fármaco-polímero pode ocorrer através de ligações covalentes, ligações iônicas ou ainda por forças de dipolos (SANTOS et al, 2015). O copolímero utilizado nesse estudo foi sintetizado dessa maneira: (figura 2)

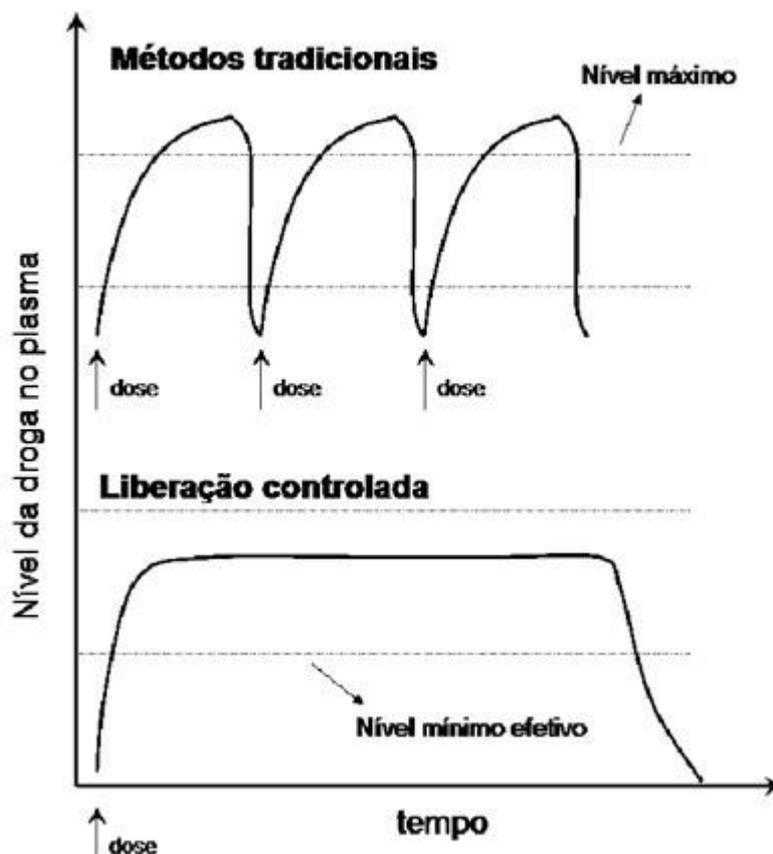
Figura 2: Copolímero PMMA-g-PEG 4000 e modificados



Fonte: SANTOS et al, 2015

Após a escolha das matrizes poliméricas são realizadas modificações nas cadeias a fim de proporcionar uma melhor interação do fármaco e o polímero e, também, verificar como cada modificação na matriz interfere na forma com que o medicamento é liberado. A liberação controlada e a liberação convencional podem ser visualizadas figura 3.

Figura 3: Liberação convencional x liberação controlada



Fonte: MORAES. S. M, 2007

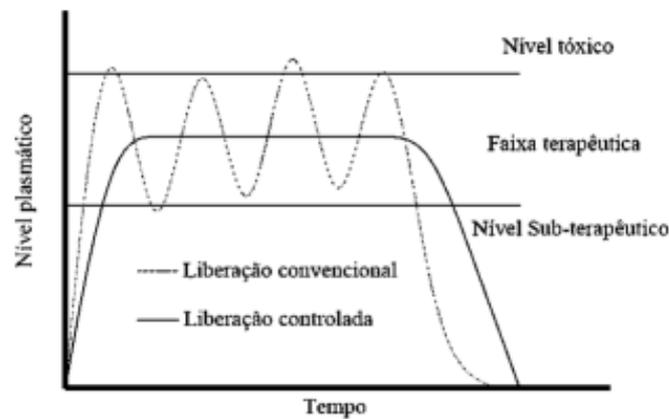
É por meio desse perfil de liberação representado no gráfico acima, que os sistemas matriarais possibilitam o fármaco de escolha desse estudo que é o antifúngico de amplo espectro, o cetoconazol, tenha como consequências positivas a diminuição dos seus efeitos adversos e uma melhor biodisponibilidade por ser um fármaco pouco solúvel, mas muito eficaz no tratamento de infecções causadas por diferentes espécies de fungos que são muito frequentes e comuns, como causadores de patologias, principalmente cutâneas nas pessoas. Porém, o cetoconazol na forma de comprimidos vem sendo substituído por outros antifúngicos administrados por via oral por apresentar efeitos adversos, como a hepatotoxicidade, o que o torna um candidato ao sistema de liberação de fármacos incorporados em matrizes poliméricas. Portanto, nesse estudo utiliza-se de modificações nas matrizes poliméricas, incorporação do fármaco, para obter uma liberação controlada do cetoconazol, trazendo inúmeros benefícios já citados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Liberação controlada de fármacos

A via de administração oral é preferencialmente escolhida para tratamento de pacientes em todo o mundo, sendo as formulações sólidas, especialmente cápsulas e comprimidos, as mais comuns no mercado. A eficácia do tratamento medicamentoso, entretanto, somente será atingida se o princípio ativo for absorvido pelo organismo e atingir seu local de ação em concentrações apropriadas. Estudos reportam que mais de 75% das novas moléculas candidatas a fármacos apresentam baixa solubilidade, baseando-se no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), e que aproximadamente 40% dos fármacos já disponíveis no mercado na forma de medicamentos são considerados pouco solúveis. Os sistemas de entrega controlada de fármacos necessitam de uma barreira química ou física para que a liberação seja proporcionada de forma lenta. Diversas técnicas têm sido estudadas com a finalidade de se obter uma barreira que seja eficaz para a liberação. Dentre elas, as que têm demonstrado serem promissoras são lipossomas, micelas, emulsões, nanoesferas e sistemas poliméricos. (SILVA. V.D.I, 2014). Liberações de doses que não atinjam níveis de toxicidade do princípio ativo muitas vezes são requeridas, o que se torna possível com a liberação retardada. A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação sustentada, pode ser visualizado na figura abaixo mostrando que a liberação controlada mantém na faixa terapêutica efetiva por um extenso período de tempo, tornando-se mais eficaz que o tratamento convencional.

Figura 4 - Níveis plasmáticos de um fármaco em diferentes sistemas de liberação.



Fonte: Adaptado de PEREIRA (2017)

A liberação controlada é a forma que torna possível por meio da interação fármaco-polímero obter uma melhor adesão do paciente ao tratamento, manter uma administração menos frequente do medicamento e a dose terapêutica se mantém constante dentro do nível efetivo do fármaco, ou seja, na faixa terapêutica com diminuição dos efeitos adversos. Com a liberação controlada, libera-se determinadas concentrações do fármaco em alvos específicos no organismo. Todas as formulações de liberação controlada utilizam uma “barreira” química ou física para proporcionar uma liberação lenta da dose de manutenção, essa “barreira”, são os polímeros, eles formam os sistemas matriciais, o fármaco pode se encontrar homoganeamente disperso em sua matriz polimérica.

O perfil de liberação que se espera é bimodal ou sigmoidal e é caracterizado por lenta liberação na fase inicial seguido por aumento na liberação na fase posterior. Este tipo de perfil de liberação pode ser terapêuticamente benéfico para liberação controlada ou sítio-específico de fármacos. A utilização de matrizes poliméricas é uma opção interessante, ou seja, as modificações nas cadeias poliméricas que serão realizadas, é por meio delas, que será possível alterar o padrão de incorporação do fármaco com o copolímero para identificar qual incorpora melhor. Essas modificações morfológicas influenciarão diretamente na forma como o fármaco será distribuído na matriz polimérica e nas interações estabelecidas entre a matriz polimérica e o fármaco, bem como na suscetibilidade que o sistema apresentará à entrada do solvente do meio de liberação. Consequentemente, a taxa de difusão do fármaco poderá ser favorecida pelo aumento da quantidade e tamanho destes poros, fornecendo um mecanismo eficiente de controle para obtenção de uma determinada taxa de liberação do fármaco pretendida.

O uso de copolímeros proporciona vantagens como: versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais. Polímeros e copolímeros são capazes de formarem um sistema de multipartículas, como microesferas e microcápsulas, no intuito de proteger, estabilizar, mascarar sabores indesejáveis dos fármacos. Polímeros são

empregados como excipientes em preparações convencionais de medicamentos e cosméticos. Excipiente é qualquer substância, diferente do fármaco, que tem sua segurança avaliada e, a partir de então, pode ser incluído na forma farmacêutica, com intenções variadas, tais como, auxiliar na preparação; fornecer estabilidade física, química e microbiológica ao produto; melhorar a disponibilidade do ativo no organismo; garantir a aceitabilidade do paciente; e, melhorar ou promover qualquer outro atributo relacionado à segurança e efetividade. Existem vários tipos de sistema de liberação de fármacos em polímeros. Nesse estudo usa-se sistemas matriciais, eles podem ser monolíticos (comprimidos ou cápsulas) ou particulados (mini comprimidos, grânulos ou pellets, incorporados em comprimidos ou cápsulas). Tais sistemas podem ser preparados a partir de polímeros solúveis em água, polímeros insolúveis erodíveis ou polímeros insolúveis inertes. Nas matrizes, o fármaco encontra-se disperso no polímero e o controle da liberação pode ocorrer por um ou mais dos seguintes mecanismos: difusão, dissolução, hidratação, precipitação, erosão e/ou degradação. Estas microesferas são micropartículas porosas que promovem a liberação gradual de fármacos. O termo nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas. Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco se encontra homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nanocápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, onde é possível se identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo. Os métodos de obtenção são semelhantes, com diferenças no mecanismo de polimerização, como será visto adiante. A diferença morfológica entre a forma farmacêutica de nanoesfera (sistema polimérico matricial) e nanocápsula (sistema polimérico do tipo reservatório), (AZEVEDO. M. M. M, 2002).

O fármaco que será incorporado no copolímero citado anteriormente é o cetoconazol, um antifúngico, que desde da década de 1970, possui grande impacto na terapia antifúngica, pelo seu largo espectro de ação, além de ter sido o primeiro antifúngico administrado por via oral. A administração usual de fármacos por vezes acaba tornando o método terapêutico ineficiente, uma vez que, após o consumo de um determinado medicamento, há o aumento da concentração do mesmo na corrente sanguínea seguido por um declínio de concentração até a intervenção de uma nova dosagem do mesmo. As oscilações desses níveis podem atingir picos em que a concentração do medicamento acarreta efeitos colaterais indesejáveis ao paciente ou pontos abaixo do nível efetivo de atuação do medicamento, fatos estes que poderiam ser evitados através de um sistema de liberação controlada.

Os sistemas de liberação controlada apresentam grandes vantagens sobre o método usual. Isso acontece devido a sua capacidade limitar a liberação do fármaco, direcionando-o de maneira mais eficaz ao seu respectivo local de ação. A utilização de biomateriais nessa terapia proporciona, entre outras vantagens, a redução na quantidade de administrações do medicamento bem como a redução das oscilações de concentração na corrente sanguínea. Em consequência disso ocorre a diminuição dos efeitos colaterais aos quais o paciente em tratamento está sujeito, aumentando a eficiência da terapia. O grande interesse por esses biopolímeros deve-se às suas características biocompatíveis, biodegradáveis e mucoadesivas, possibilitando uma grande variedade de aplicações nas ciências biológicas e farmacêuticas, bem como em processos industriais. (MOREIRA, 2017).

2.2 Polímeros usados na liberação controlada de fármacos

Os polímeros são as substâncias mais comumente utilizadas como carreadores para a produção de dispersões sólidas, pois são capazes de produzir sistemas amorfos com grande eficiência. Isso ocorre em função dos grupamentos ligantes presentes em sua estrutura que permitem a solubilização de fármacos em menor ou maior escala, dependendo de características como lipofilicidade, possibilidade de realizar ligação de hidrogênio (comoceptor ou doador). A utilização de polímeros na indústria farmacêutica é uma resposta inovadora para a obtenção de qualidade nos tratamentos com o uso de medicamentos e tem sido muito usada atualmente. Principalmente para aqueles medicamentos que possuem uma elevada toxicidade, o que pode ocorrer por consequência de uma posologia que não seja prática ao dia a dia ou medicamentos que tenham a dose terapêutica próxima a dose tóxica. Isso pode ser resolvido com a liberação controlada, que ocorre com os polímeros incorporados ao fármaco. Nesse estudo é usado o copolímero PMMA-g-PEG 4000.

O copolímero são polímeros formados por mais de um tipo de monômero. Foi escolhido por apresentar boa solubilidade, não tóxico não abrasivo, hidrofílico pela presença do polietilenoglicol (PEG) excelente candidato para o uso como matriz de liberação de fármacos devido a sua biodegradabilidade, capacidade de liberar fármacos de vários tamanhos e polaridades, além de sua capacidade de aumentar a estabilidade química e/ou física de fármacos e proteínas incorporada em sua estrutura. É de fácil processamento, e por meio de diferentes unidades de repetição, na sua produção é possível alterar propriedades e comportamento do mesmo. A interação fármaco-polímero pode ocorrer através de ligações

covalentes, ligações iônicas, e com isso, ocorre à incorporação ao fármaco cetoconazol na sua cadeia polimérica.

Os principais polímeros naturais utilizados em matrizes para liberação controladas são os hidrogéis de quitosana, alginato, sulfato de condroitina, gelatina, dextrina, hialuronana e poli(lisina). Exemplos de polímeros sintéticos usados em liberação controlada são: bisacrilamida, poli(acrilamida) (PAm), PEG, PVA, PAA, poli (ácido metacrílico) (PMAA), poli(acrilato de butila) (PBA), poli(metacrilato de metila) (PMMA), poli(N-isopropil acrilamida), PVP, poli(fosfazona), PLA, PCL, poli(metacrilato de 2-hidroxieta) (PHEMA), poli(oligo(óxido de etileno)monometiléter metacrilato) (POEOMA) contendo ligações cruzadas por grupos tióis e copolímeros diversos.

As propriedades usadas dos polímeros são exploradas nos medicamentos podem ser, os polímeros biodegradáveis podem ser definidos como aqueles que sofrem degradação macromolecular in vivo, por ação de enzimas, micro-organismos ou células. O termo biodegradação descreve os processos envolvendo quebra de cadeia e modificações da massa molar e da solubilidade do polímero.

Polímeros bioadesivos são materiais capazes de se ligarem a substratos biológicos de duas maneiras: aderindo à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos). A bioadesão é uma propriedade explorada como estratégia para aumentar o tempo de permanência de um medicamento no organismo. Os hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais contendo elevada quantidade de água. São materiais obtidos, normalmente, a partir da copolimerização entre monômeros ou polímeros hidrofílicos com comonômeros polifuncionais, que promovem ligações cruzadas. A presença destas últimas confere aos mesmos a capacidade de absorver grande quantidade de água sem se dissolverem. Os polímeros ditos bioativos e biomiméticos também vêm sendo pesquisados. Materiais biomiméticos são definidos como aqueles que podem interagir, seletivamente, com o microambiente biológico, mimetizando-o. Já os polímeros bioativos são aqueles capazes de interagir com receptores celulares, via reconhecimento biológico, proporcionando respostas específicas. Por último, os polímeros terapêuticos são aqueles aos quais são atribuídas propriedades terapêuticas. O controle da funcionalização e arquitetura de polímeros sintéticos permite que estes se liguem à receptores específicos, presentes em patógenos ou células, promovendo reconhecimento ou comunicação, respectivamente, desencadeando a modulação de respostas inflamatórias, adesão celular ou transdução de sinais. Polímeros contendo fármacos enxertados também são, frequentemente, denominados terapêuticos. (VILLANOVA,2010).

2.3 Cetoconazol

Foi descoberto em 1976 pela Janssen Pharmaceuticals, o cetoconazol foi patenteado em 1977 e passou a ser usado na medicina em 1981. O nome químico dele é cis-1-acetil-4-[4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1Himidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxalan-4-il]metoxifenil]-piperazina, de fórmula e massa molecular $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ e 531,44 g mol⁻¹. É rapidamente absorvido por via oral. Após a administração oral das doses de 200, 400 e 800 mg, o pico de concentração plasmática é de aproximadamente 4, 8 e 20 µg mL⁻¹, respectivamente, após um período de duas a três horas, variando a absorção com o estado de acidez gástrica, sendo maior em pH igual ou inferior a dois. O composto é convertido em diversos metabólitos inativos, sendo que as principais vias metabólicas identificadas são a oxidação e degradação dos anéis imidazólico e piperazínico, o-dealquilação oxidativa e hidroxilação aromática. Apenas uma pequena fração (inferior a 1%) da dose administrada é excretada, sem mudanças, na urina após um período de seis horas. (DANTAS, S. N. A, 2010).

O cetoconazol apresenta-se como pó branco, levemente amarelado, inodoro, facilmente solúvel em diclorometano, solúvel em ácidos e em metanol, parcialmente solúvel em etanol e praticamente insolúvel na água (PERARO, 2001), o que diminui sua biodisponibilidade por ser um fármaco que precisa ser absorvido sistemicamente e tem pouca solubilidade em água, e com o uso do copolímero, o fármaco torna-se mais biodisponível por ser liberado de forma controlada e mais direcionado ao seu local de ação.

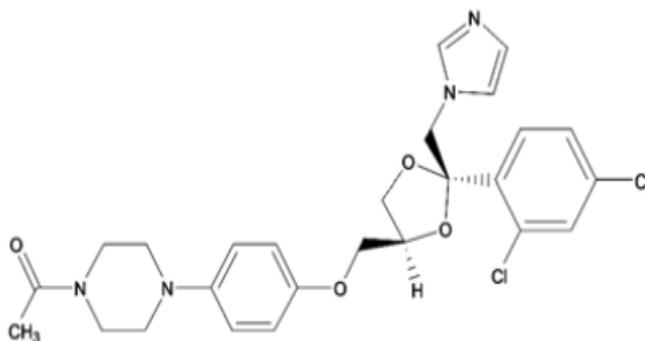
O cetoconazol é um derivado sintético do imidazol dioxolano, com atividade fungistática (agente que paraliza crescimento dos fungos) contra *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*. Menos sensíveis são *Aspergillus spp*, *Sporothrix schenckii*, alguns *Dematiaceae*, *Mucor spp* e outros ficomicetos, exceto *Entomophthorales*. Utilizado no tratamento de infecções ginecológicas, pneumonia fúngica, na profilaxia de micoses em pacientes imunodeprimidos (Goodman & Gilman, 2005). O cetoconazol possui ação a partir da inibição da biossíntese do ergosterol, um importante componente para formação da membrana celular fúngica (CARAZO, 1999), é da classe dos azólicos, que atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica. Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos. Tem ação elevada contra leveduras, em infecções tópicas ou sistêmicas. Ele apresenta amplo espectro contra *Candida sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, entre outros dermatófilos e é um agente fungicida contra *Pityrosporum ovale*, agente etiológico da dermatite seborreica. No mercado nacional apresenta-se nas formas de comprimidos, creme dermatológico e xampu (RUBIM, 2012).

Ele apresenta casos de hepatotoxicidade grave, incluindo casos fatais ou que necessitaram de transplante hepático, ocorreram com o uso de cetoconazol oral. Alguns pacientes não apresentavam fator de risco para distúrbio hepático. Há relatos de ocorrência dentro de um mês de tratamento, incluindo alguns na primeira semana. O acúmulo de doses do tratamento é considerado um fator de risco para hepatotoxicidade grave. Monitorar a função hepática em todos os pacientes em tratamento com cetoconazol.

Além disso, ele se tornou um fármaco de escolha nessa pesquisa por muitas vezes em sua forma farmacêutica convencional não apresentar uma boa biodisponibilidade e ser causador de efeitos adversos, por apresentar uma alta toxicidade, isso se deve ao risco de toxicidade hepática grave. Ele vem sendo substituído por outros antifúngicos administrados por via oral por apresentar essa hepatotoxicidade, mesmo sendo um antifúngico com muita eficácia e capaz de tratar infecções causadas por diferentes espécies de fungos.

Portanto, nesse estudo utiliza-se de modificações nas matrizes poliméricas, incorporação do fármaco, para obter uma liberação controlada do cetoconazol, trazendo inúmeros benefícios já citados, que proporcionaram um tratamento de qualidade aos pacientes que farão uso desse antifúngico.

Figura 5 - Estrutura do fármaco cetoconazol.



Fonte: SOUZA, 2020.

2.4 *Candida albicans*

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água e, embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos. Leveduras são fungos capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda

do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. Dentre as centenas de espécies descritas, leveduras do gênero *Candida* são os maiores agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. As leveduras têm como estrutura primária, células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral, de forma arredondada. Estas células são esporos de origem assexuada e se denominam blastoconídios. Alguns gêneros de leveduras menos importantes em micologia médica, reproduzem-se por fissão. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Módulo VII, 2004).

Um grande problema está associado ao aumento de resistência dos fungos patogênicos aos agentes utilizados no esquema terapêutico e ao número limitado de drogas para a cura dessas infecções.

O estudo “Atividade anti-*Candida albicans* da associação do citronelal com a anfotericina B ou com o cetoconazol”, teve como objetivo estudar a atividade antifúngica do citronelal isoladamente e em associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol. Assim como Beneditti, Fornari e Schervinski (2011) que mostraram que a *C. albicans* foi a espécie que apresentou maior sensibilidade ao cetoconazol com concentrações consideravelmente mais baixas. Os valores das MIC's apresentados por este trabalho para o cetoconazol foram mais elevados do que os relatados por outros autores. (Silva, 2014). Em outro estudo, realizado pela I. M. N. de Castro *et al*, (2016), 593 cepas de *Candida* spp., das quais 420 eram *C. albicans*, os quatro imidazólicos testados (econazol, clotrimazol, miconazol e cetoconazol) foram ativos de 94,3% a 98,5% com MIC <1 µg/mL.

3- JUSTIFICATIVA/ RELEVÂNCIA

Estudos de materiais poliméricos para uso na liberação controlada de fármacos é uma técnica que está em ascensão, que possibilita melhorias na adesão e no tratamento de diversas doenças, e é de ampla importância na área farmacêutica. Muitos fármacos disponíveis para os tratamentos são usados da maneira convencional, sem a liberação controlada, o que pode trazer riscos ao paciente, dependendo da dose, ou efeitos adversos, por isso um determinado tipo de medicamento, que possui muito efeito adverso, ou seja, de baixa solubilidade, impede de torna-los uma opção para o tratamento dependendo também do histórico do paciente, como por exemplo, um fármaco hepatóxico para pacientes com doenças hepáticas. O presente estudo, também será uma referência para desenvolvimento de pesquisa com outros fármacos que poderão ser útil o processo de liberação controlada, mediado pelo sistema matriarcal com a utilização de copolímeros. Portanto, conseguimos obter através da incorporação fármaco-copolímero no sistema de liberação controlada muitos benefícios como diminuição de efeito adversos, dose eficiente e terapêutica e melhor adesão do paciente ao tratamento. Podendo ser útil para outros tratamentos ou fármacos que possuem uma dose terapêutica próxima a dose tóxica, ou que possuem muito mais efeitos adversos que o cetoconazol e são fármacos que se evitam a utilização por esses motivos, mas que possuem efetividade, aumentando assim, as possibilidades de tratamento do paciente.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a liberação controlada e estudo da atividade antifúngica do fármaco no copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros modificados incorporados com cetoconazol.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Fazer um levantamento bibliográfico de estudo da liberação controlada de fármacos;
- b) Incorporar o cetoconazol em matrizes poliméricas (PMMA-G-PEG 4000
- c) Testar a solubilidade do cetoconazol, do copolímero PMMA-G-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados incorporados com o cetoconazol;
- d) Avaliar a liberação controlada do cetoconazol;
- e) Realizar o teste de eficiência da incorporação, do copolímero PMMA-G-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados;
- f) Realizar o ensaio antifúngico para *C. albicans*;
- g) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do copolímero PMMA-G-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados incorporados com o fármaco cetoconazol;

5- METODOLOGIA

5.1 Síntese do copolímero PMMA-g-PEG4000 e copolímeros PMMA-g-PEG4000 modificados

1.1 Síntese do copolímero PMMA-g-PEG4000

Em um balão de fundo redondo de 25,00mL foram adicionados cerca de 5,00 gramas de polietilenoglicol 4000 (PEG4000) e dissolvidos em 12,5mL de diclorometano. Adicionou-se, posteriormente, 0,35mL de metacrilato de metila (MMA) e $6,25 \times 10^{-3}$ gramas de peróxido de benzoíla. Esse sistema reagiu por seis horas em banho de óleo a 80°C, sob refluxo e agitação magnética. O conteúdo foi transferido para um béquer de 50,00mL e o diclorometano foi evaporado na estufa a 40°C (SANTOS R.M.V. et al, 2015, 19).

1.2 Síntese do copolímero acetilado: PMMA-g-PEG4000 ACET

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,00g do copolímero PMMA-g-PEG4000 e o mesmo foi solubilizado em 10,00mL de diclorometano. Em outro béquer preparou-se uma solução de 5,00mL de anidrido acético em 5,00mL de ácido acético, que foi adicionado ao balão contendo o copolímero. A mistura reacional foi aquecida em um sistema de refluxo em banho-maria por 30 minutos. Ao término da reação, a mistura foi vertida em um béquer com 100.00mL de água gelada. O copolímero modificado solidificou e o mesmo foi separado por filtração simples. A fase orgânica foi recolhida e após a evaporação do solvente, foi obtido um sólido seco em forma de filme. (SANTOS R.M.V. et al, 2015, 19).

1.3 Síntese do copolímero halogenado: PMMA-g-PEG4000 HAL

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,00g do copolímero e o mesmo solubilizado em 10mL de diclorometano. Foram adicionados 0,50mL de HCl a mistura. O sistema foi aquecido em sistema de refluxo e banho-maria por 40 minutos. Em seguida a mistura foi vertida em um funil de separação para que a fase orgânica pudesse ser separada da aquosa. Após a separação de fases foi adicionado 5,00mL de NaHCO₃ 5%. A fase orgânica foi recolhida e o solvente evaporou em estufa a 40°C, obtendo um produto sólido. (SANTOS R.M.V. et al, 2015, 19).

1.4 Síntese do copolímero esterificado: PMMA-g-PEG4000 EST

Em um balão de fundo redondo 2,00g do copolímero foram solubilizados em 10,00mL de diclorometano. Em um béquer foi preparada uma mistura com 0,10mL de ácido sulfúrico concentrado e 7,00mL de ácido acético. Essa mistura foi adicionada ao balão contendo o copolímero solubilizado que foi colocado em um sistema de refluxo e banho-maria a 40°C por 65 minutos. Depois de esfriar o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação e foram adicionados 10,00mL de água. A fase orgânica foi recolhida e colocada na estufa para secar a 40°C. (SANTOS R.M.V. et tal, 2015, 19).

1.5 Síntese do copolímero etilado: PMMA-g-PEG4000 ETI

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,00g do copolímero, 10,00mL de hidróxido de sódio dissolvido em igual volume de água destilada e 10,00mL de diclorometano. O balão foi aquecido em banho de óleo com agitação magnética e refluxo por 45 minutos. Foi adicionado 2,40mL de iodeto de etila e a mistura reacional foi mantida sob refluxo e na temperatura de 40°C por 4 horas. Ao final da reação a mistura foi transferida para um funil de separação e foram adicionados 10,00mL de água, 20,00mL de diclorometano e 10,00mL de NaCl saturado para a separação de fases. A fase orgânica foi coletada, foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado em estufa (SANTOS R.M.V. et tal, 2015, 19).

5.2 Incorporação do Antifúngico Cetoconazol no copolímero PPMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados

O cetoconazol (em pó) foi incorporado à cadeia da matriz polimérica de PMMA-g-PEG 4000 e modificados através da junção de fase orgânica e aquosa. Fase aquosa: colocou-se em uma chapa aquecedora um béquer contendo água, e quando esta atingiu a temperatura de aproximadamente 70°C, adiciona-se álcool polivinílico (PVA), sob agitação, até sua completa dissolução. Fase orgânica: em outra chapa aquecedora, colocou-se aproximadamente 6mL de diclorometano em um béquer. Quando o solvente alcançar a temperatura de aproximadamente 30°C adicionou-se copolímero e o Cetoconazol. Esse sistema foi mantido sob agitação até completa dissolução. Após o preparo das duas fases, a fase aquosa foi vertida sobre a fase orgânica. A mistura foi submetida à agitação magnética, por quatro horas, sob refluxo. Em seguida, os produtos foram levados à estufa para total evaporação do solvente (SANTOS R.M.V. et tal, 2015, 19).

5.3 Determinação da eficiência do Cetoconazol incorporado

Colocou-se em um béquer de 100 ml, 0,20mg da matriz polimérica pura ou modificada incorporado com o fármaco e 50mL de solvente, somente o fármaco que deve ser solúvel no

solvente utilizado, sob agitação e com aquecimento, abaixo da temperatura de ebulição do solvente (diclorometano), por 1h. Em seguida, filtrou a solução contendo o fármaco diluído e deixou em repouso por 24h na temperatura ambiente e em estufa a 30°C para a evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente, pesou o sólido residual e calculou a massa do fármaco incorporado e converteu-se para percentual de fármaco incorporado.

A eficiência de incorporação do copolímero com Cetoconazol foi estimada a partir da massa (copolímero + cetoconazol + PVA) antes e após a liberação do Cetoconazol utilizando a Equação 1 e comparando com a eficiência de incorporação teórica. Após a incorporação, o cetoconazol presente no copolímero foi dissolvido em solução tampão de pH 7,2. O sólido resultante continha apenas o copolímero que foi filtrado, seco em estufa a 40 ° C e pesado para determinar a massa do fármaco incorporado por diferença de massa.

$$\% \text{ Eficiência de incorporação} = \text{WK} \div \text{WT} \times 100 \text{ Eq. (1)}$$

onde WT (Wtotal) são as massas do polímero, PVA e Cetoconazol, respectivamente. WK (WKetoconazol) é a massa do cetoconazol seco após o cálculo da diferença de peso.

5.4 Teste de solubilidade do fármaco

Para o teste de solubilidade, 0,1 g do cetoconazol, PMMA-g-PEG 4000, PMMA-g-PEG 4000 acetilado, PMMA-g-PEG 4000 esterificado, PMMA-g-PEG 4000 etilado, PMMA-g-PEG 4000 halogenado, PMMA-g-PEG 4000 incorporado com cetoconazol, PMMA-g-PEG 4000 acetilado e incorporado com cetoconazol, PMMA-g-PEG 4000 esterificado e incorporado com cetoconazol, PMMA-g-PEG 4000 etilado e incorporado com cetoconazol e PMMA-g-PEG 4000 halogenado e incorporado com cetoconazol, foram dissolvidos em 3,0 mL de solvente sob agitação. Os solventes usados foram água, etanol, dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio, diclorometano e hexano.

5.5 Determinação da curva padrão

1.1 Solução Tampão

Para a metodologia de liberação foi utilizada uma solução tampão de pH 7,2, uma vez que a mesma mimetiza o pH sanguíneo.

Para 540 ml de tampão de pH 7,2 usa-se 3,64g de fosfato de potássio monobásico em 135 ml de água Milli-Q em 0,756g de hidróxido de sódio em 94,5 ml de água Milli-Q. Por fim, completar com água, e verificar com o pHmetro se o pH está adequado. (Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010).

1.2 Curva Padrão

A curva padrão foi realizada com o preparo de soluções contendo o copolímero modificado e a solução tampão de pH 7,2 em concentrações crescentes em balões volumétricos de 10mL. Cada solução foi analisada no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm. Os valores das absorvâncias obtidas para cada concentração foram registrados. A partir da análise dos dados foram escolhidas as leituras em 225nm por terem formado uma curva padrão com r^2 mais próximo de 1.

5.6 Liberação Controlada do Cetoconazol

1.1 Determinação do pH do meio em que ocorre a liberação do Cetoconazol

O pH do meio, utilizado para o estudo de liberação controlada do Cetoconazol, foi o mesmo fornecido pela Farmacopéia Brasileira.

1.2 Análise da matriz do copolímero PMMA-G-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados no espectrofotômetro de UV-Vis

Uma solução da matriz polimérica foi colocada numa cubeta e em seguida, realizou-se a varredura de 200-800nm para a determinação da absorvância máxima e o comprimento de onda máxima da matriz polimérica. Após a leitura, foi construído um gráfico de absorvância versus comprimento de onda.

1.3 Análise do Cetoconazol no espectrofotômetro de UV-Vis

Uma solução do fármaco foi colocada numa cubeta e em seguida, foi realizada a varredura de 200-800nm para a determinação da absorvância máxima e o comprimento de onda máximo do fármaco. Lembrando que, é necessário comparar o comprimento de onda máximo do Cetoconazol com os dados fornecidos pela Farmacopéia Brasileira. Após a leitura, construiu-se o gráfico de absorvância versus comprimento de onda.

1.4 Análise de Liberação controlada do cetoconazol

A liberação do Cetoconazol no UV-Vis foi realizada a partir da retirada de alíquotas de uma determinada concentração em um tempo pré-determinado a cada 15 min, no pH do meio determinado pela Farmacopéia (pH 7,2). A cada 15 min uma quantidade de amostra foi colocada em uma cubeta e fez a leitura no comprimento de onda máximo do cetoconazol. O período de liberação do fármaco, geralmente, para este tipo de matriz polimérica é de 4h, mas varia para cada fármaco.

5.6 Análises AFM do copolímero PMMA-G-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados incorporados com cetoconazol

Amostras para análise de AFM foram preparadas pelo método de *spin-coating*, utilizando solução de diclorometano 0,7 mg / ml sobre substrato de mica e foram secas, após 30s, por fluxo de nitrogênio. Em todos os casos, mudanças consideráveis na organização do filme, produzidas por uma modificação da cadeia do copolímero e pelo processo de incorporação.

5.7 Avaliação antifúngica in vitro

Foram usadas coleções padrões da American type culture collection (ATCC). O fungo leveduriforme: *Candida albicans* ATCC 14408. A triagem de atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o método de difusão em poço, descrita por Okunji e colaboradores, com modificações. (OKUNJI et al., 1990). Para a espécie leveduriforme, foi utilizado como controle positivo cetoconazol (100 µg/mL). Como controle negativo, para todas as espécies, foi utilizado DMSO. A levedura foi repicada em Ágar Sabouraud (Predimol®). Para a levedura, os inóculos foram preparados em salina (NaCl 0,9%), de modo a se obter suspensões de turvação referente ao tubo 0,5 da escala McFarland (1 x 10⁸ UFC/mL), (AMPARO, 2016).

Placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton ou ágar Sabouraud foram perfuradas, obtendo-se orifícios de 6 mm de diâmetro. Posteriormente, as placas foram inoculadas com as suspensões microbianas, por semeadura de superfície, com auxílio de swab. Em seguida, 50 µL das soluções dos EEBs, frações, controle positivo e controle negativo foram aplicadas nos orifícios das placas e estas foram incubadas por 24/48 horas em estufa a 37±2 °C (AMPARO, 2016).

Após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento foram medidos com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo®, Brasil).

Todos os testes foram realizados em triplicata e a viabilidade microbiana foi avaliada pelo cálculo da porcentagem (%) de crescimento microbiano do teste em relação ao controle de crescimento.

O inóculo foi preparado utilizando o método de suspensão direta de colônias por meio de uma suspensão salina (NaCl a 0,9%) de colônias selecionadas a partir de uma placa de ágar de 48 horas, antes de cada ensaio. A suspensão é ajustada para atingir uma turbidez equivalente a 0,5 da escala padrão da *McFarland* (1×10^8 UFC / mL). O inóculo é diluído em RPMI1640 para obter um ensaio final com $2,5 \times 10^3$ UFC / mL. As soluções de polímeros foram feitas em RPMI1640 para obter concentrações finais de 1000,00 a 0,49 $\mu\text{g} / \text{mL}$. 50 μL de amostra e 50 μL de inóculo adicionados a uma placa de 96 poços.

Para o controle de crescimento, foram colocados somente 75 μL de meio de cultura. No controle positivo, foram adicionados 50 μL de caldo e 25 μL de cetoconazol a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No controle negativo, foram adicionados 50 μL de metanol e 75 μL de caldo. As placas ficaram fechadas e incubadas a 37 ° C, por 48 h. Após o período de incubação, 30 μL de trifetil tetrazólio cloreto (TTC, 0,25 mg / mL) adicionou-se as placas incubadas por 3 h adicionais. A MIC foi feita em triplicata e estabelecida como a menor concentração em que nenhum crescimento de levedura foi detectado (sem cor visível), (AMPARO, 2016).

5.8 Viabilidade Celular

As células (fibroblastos) tratadas com a amostra dissolvida em RPMI 2% DMSO, em concentrações variando de 1000,0 a 62,5. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de sulforodamina B. Após 24 h de incubação, o meio foi removido e as células fixadas com ácido tricloroacético a 20% frio por 1 hora a 4° C. A placa de microtitulação foi então lavada com água destilada e seca. Depois disso, as células fixas foram coradas por 30 minutos com SRB a 0,1% dissolvido em ácido acético a 1%. A placa foi lavada novamente com ácido acético a 1%, novamente deixada secar, em seguida adicionou-se 200 μL de tampão TRIS 10 mM (pH 10,5) para solubilizar a mancha à temperatura ambiente durante cerca de 30 min. A absorvância das amostras lidas no espectrofotômetro (490 nm) e os resultados expressos como a porcentagem de células viáveis em relação às células não tratadas.

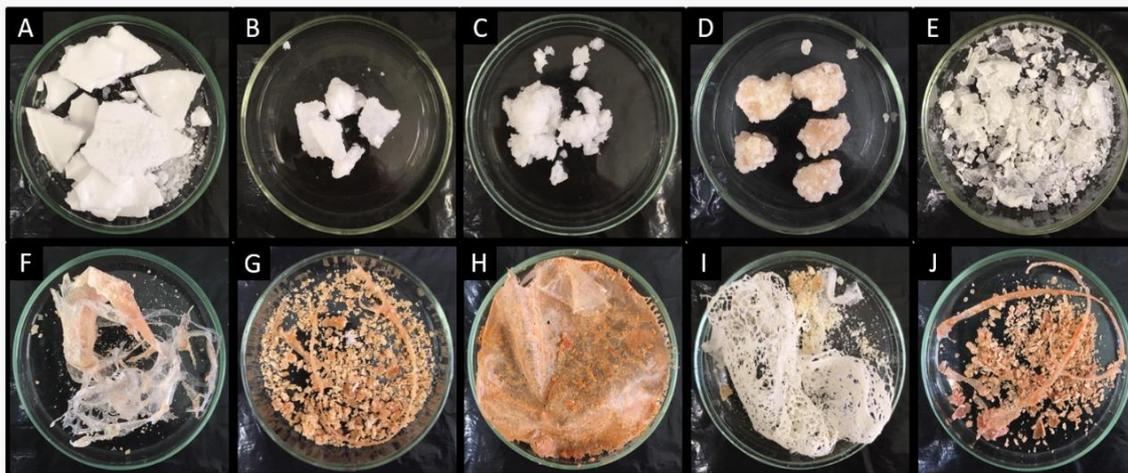
6- RESULTADOS

6.1 Sínteses e Incorporação do cetoconazol do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-G-PEG 4000 modificados.

Nessa etapa após a evaporação total do solvente, ocorreu a formação de diferentes filmes de matrizes poliméricas incorporadas. Os rendimentos dos copolímeros obtidos na incorporação do

cetoconazol foram entre 70% e 80%. O aspecto físico dos copolímeros e copolímeros incorporados é mostrado na Figura 6, antes da incorporação o aspecto das matrizes são diferentes, mais segregados, após a incorporação do fármaco nota-se a formação de um filme com a matriz polimérica e as microesferas com o fármaco incorporado.

Figura 6 – PMMA-g-PEG 4000 incorporados de A-J

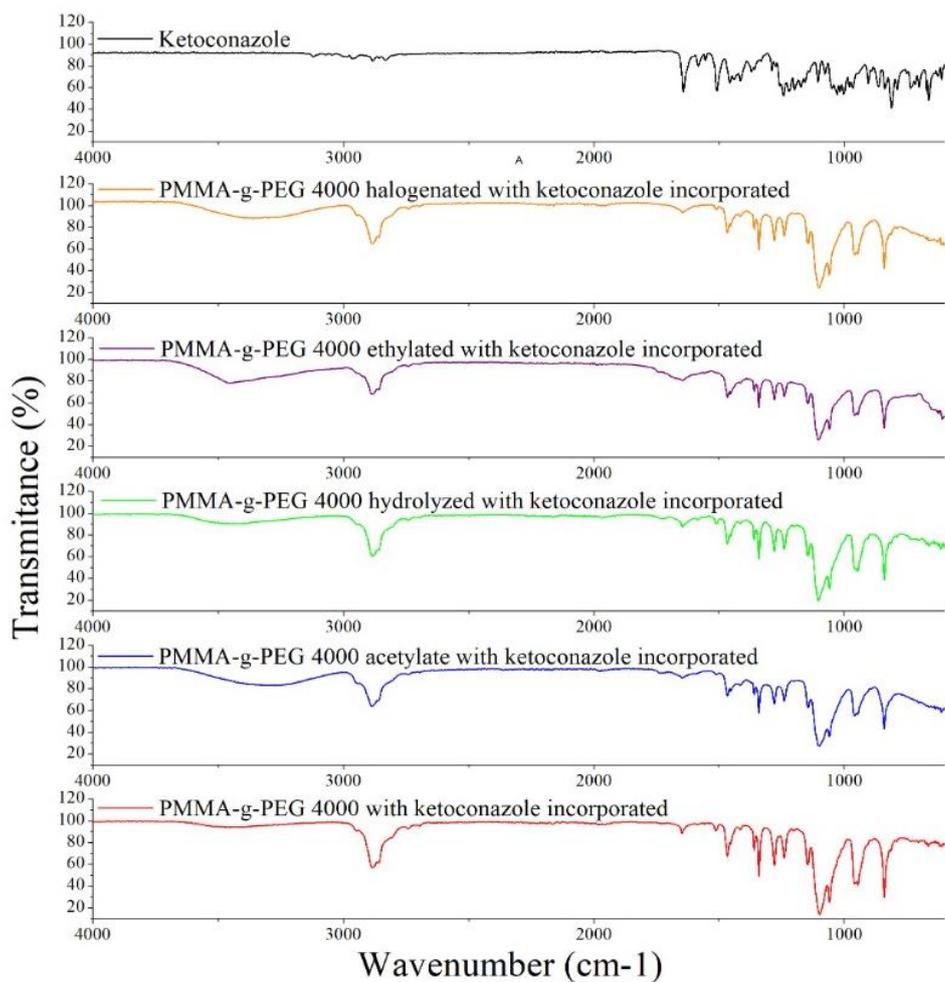


Legenda: Das letras A – E são copolímeros puro e modificado, sendo que o A: PMMA-g-PEG 4000, B: PMMA-G-PEG 4000 acetilado, C: PMMA-G-PEG 4000 esterificado, D: PMMA-G-PEG 4000 etilado, E: PMMA-G-PEG 4000 halogenado. Do F – J são copolímeros modificados e incorporados com o fármaco F: PMMA-G-PEG 4000 incorporado com cetoconazol, G: PMMA-G-PEG 4000 acetilado e incorporado com cetoconazol, H: PMMA-G-PEG 4000 esterificado e incorporado com cetoconazol, I: PMMA-G-PEG 4000 etilado incorporado com cetoconazol, J: PMMA-G-PEG 4000 halogenado incorporado com cetoconazol

6.2 Análises de Infravermelho do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-g-PEG 4000 modificados incorporados com cetoconazol

Nos espectros de infravermelho, confirmam-se as incorporações e modificações na cadeia polimérica, sendo verificado pelo aparecimento de bandas referentes aos grupos inseridos: $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ (1700-1720 cm^{-1}), CH_2CH_3 (1420 e 1350 cm^{-1}), $\text{O}=\text{C}-\text{OC}$ (1050-1300 cm^{-1}) e Cl (600-800 cm^{-1}). As bandas que são relativas ao fármaco são os estiramentos axiais referentes à ligação $\text{C}=\text{C}$ dos sistemas aromáticos em 1600, 1507 e 1466 cm^{-1} , o estiramento axial assimétrico da ligação $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ em 1240 cm^{-1} , e em 1258 cm^{-1} é observado o estiramento axial da ligação $\text{C}-\text{N}$

Figura 7- Espectro infravermelho de cetoconazol e PMMA-g-PEG 4000 modificados e incorporados



Legenda: Cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 halogenado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 etilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 hidrolisado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 acetilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 incorporado com cetoconazol;
Transmitância (%) versus Número de onda (cm-1)

6.3 Testes de solubilidades do fármaco, PMMA-g-PEG, PMMA-g-PEG modificados e incorporados

Tabela 1: Solubilidades em diferentes solventes orgânicos

Amostra	Água		Etanol		Dimetilsulfoxónio		Acetona		Clorofórmio		Diclorometano		Hexano		Solução Tampão
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1
Cetoconazol	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
PMMA-g-PEG 4000	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 acetilado	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 hidrolisado	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 etilado	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 halogenado	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 com cetoconazol incorporado	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 acetilado com cetoconazol incorporado	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 hidrolisado com cetoconazol incorporado	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
PMMA-g-PEG 4000 etilado com cetoconazol incorporado	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-

PMMA-g-PEG

4000

halogenado

- - - - - - - - + + + + - - -

com

cetoconazol

incorporado

Legenda: Cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000, PMMA-G-PEG 4000 acetilado, PMMA-G-PEG 4000 etilado, PMMA-G-PEG 4000 esterificado, PMMA-G-PEG 4000 halogenado, PMMA-G-PEG 4000 incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 acetilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 esterificado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 etilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 halogenado incorporado com cetoconazol; T1=ambiente; T2 = sob aquecimento; + solúvel, - não solúvel.

Os solventes que foram solúveis foram o clorofórmio e o diclorometano, porém o solvente escolhido foi o diclorometano, por apresentar um menor ponto de ebulição, ser solúvel no fármaco cetoconazol, ser menos tóxico que o clorofórmio.

6.4 Eficiência de incorporação

A Tabela 2 mostra a eficiência da incorporação de cada copolímero. O PMMA-g-PEG 4000 INCORP CETO e o PMMA-g-PEG 4000 HALOG INCORP CETO, que apresentaram os maiores valores de eficiência na incorporação por apresentarem maior interação das funções químicas do copolímero com o cetoconazol. O PMMA-g-PEG 4000 hidrolisado com cetoconazol incorporado apresentou baixa interação com o fármaco. Incorporar demais o fármaco irá interferir na liberação controlada, pois o fármaco interage com a matriz através de ligações covalentes, ligações iônicas ou ainda por forças de dipolos (SANTOS et al, 2015). Quanto mais forte essa interação o fármaco pode não ser liberado, o contrário também pode acontecer, com uma interação muito fraca o fármaco pode ser liberado rapidamente, não alcançando a faixa terapêutica do fármaco.

Tabela 2 - Eficiência prática para incorporação dos copolímeros com cetoconazol.

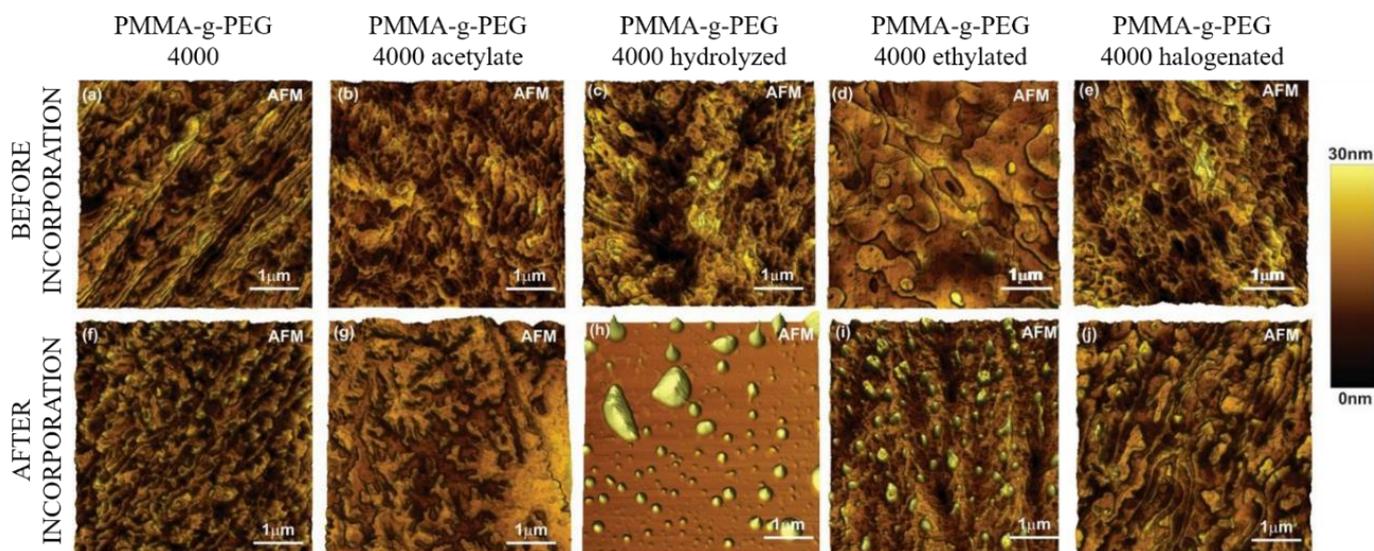
| Polímero com cetoconazol | Massa de cetoconazol (g) | Eficiência de incorporação (%) |
|------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| PMMA-G-PEG 4000
INCORP CETO | 0,3122 | 87,93 |
| PMMA-G-PEG 4000
ACET INCORP CETO | 0,3246 | 83,02 |
| PMMA-G-PEG 4000
HIDROL INCORP
CETO | 0,2896 | 76,46 |
| PMMA-G-PEG 4000
ETI INCORP CETO | 0,2611 | 80,00 |
| PMMA-G-PEG 4000
HALOG INCORP
CETO | 0,3401 | 87,59 |

Legenda: PMMA-G-PEG 4000 incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 acetilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 hidrolisado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 etilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 halogenado incorporado com cetoconazol.

6.5 Análises AFM do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-g-PEG4000 modificados e incorporados com cetoconazol

Na figura 8 as amostras para análise AFM, é possível observar a formação de microesferas isoladas, denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco se encontra homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica, nas seguintes imagens (h) PMMA-g-PEG hidrolisado (diâmetro $\sim (120 \pm 41)$ nm) e em (l) PMMA-g-PEG ETI (diâmetro $\sim (95 \pm 15)$ nm) Imagens AFM mostram que a formação de microesferas ocorre para PMMA-g-PEG hidrolisado (h) e PMMA-g-PEG ETI (l), o que é indicativo de um processo de incorporação bem-sucedido. A imagem AFM também mostra variações significativas na rugosidade da amostra e na organização do filme, provavelmente devido à interação entre a droga e o copolímero. O mesmo comportamento ocorre com (f) copolímero PMMA-g-PEG 4000, (g) copolímero PMMA-g-PEG 4000 ACET e (i) copolímero PMMA-g-PEG 4000 incorporado.

Figura 8 - AFM de PMMA-g-PEG 4000 modificados antes (a-e) e depois (f-j) do processo de incorporação.



Legenda: PMMA-G-PEG 400, PMMA-G-PEG 400 acetilado, PMMA-G-PEG 400 hidrolisado, PMMA-G-PEG 400 etilado e PMMA-G-PEG 400 halogenado. Antes da incorporação x Depois da incorporação.

6.6 Avaliação antifúngica in vitro

Após a incorporação e caracterização de PMMA-g-PEG e modificados incorporados, a atividade biológica foi avaliada e os valores correspondentes de MIC estão apresentados na Tabela 3. Este fungo é um membro do microbiota, mas diante de um desequilíbrio com o hospedeiro, o ser humano, pode causar infecções superficiais da pele (candidíase oral ou vaginal) e infecções sistêmicas com risco de vida (infecções da corrente sanguínea). O cetoconazol é um dos antifúngicos eficazes utilizados no tratamento de infecções por *C. albicans*, porém várias cepas resistentes têm sido relatadas. Os copolímeros sintetizados podem ser uma alternativa terapêutica. Todos os copolímeros incorporados com cetoconazol apresentaram atividade contra *C. Albicans*. O acetilato de PMMA-g-PEG 4000 com cetoconazol incorporado foi o menos ativo (maior MIC). Considerando a eficiência de incorporação (Tabela 3), o PMMA-g-PEG 4000 com cetoconazol incorporado, o PMMA-g-PEG 4000 hidrolisado com cetoconazol, o PMMA-g-PEG 4000 etilado com cetoconazol incorporado e o PMMA-g-PEG 4000 halogenado com cetoconazol incorporado foram capazes de reduzir a MIC.

Tabela 3 - Avaliação antifúngica in vitro do copolímero PMMA-g-PEG 4000 e copolímeros PMMA-g-PEG 4000 modificados.

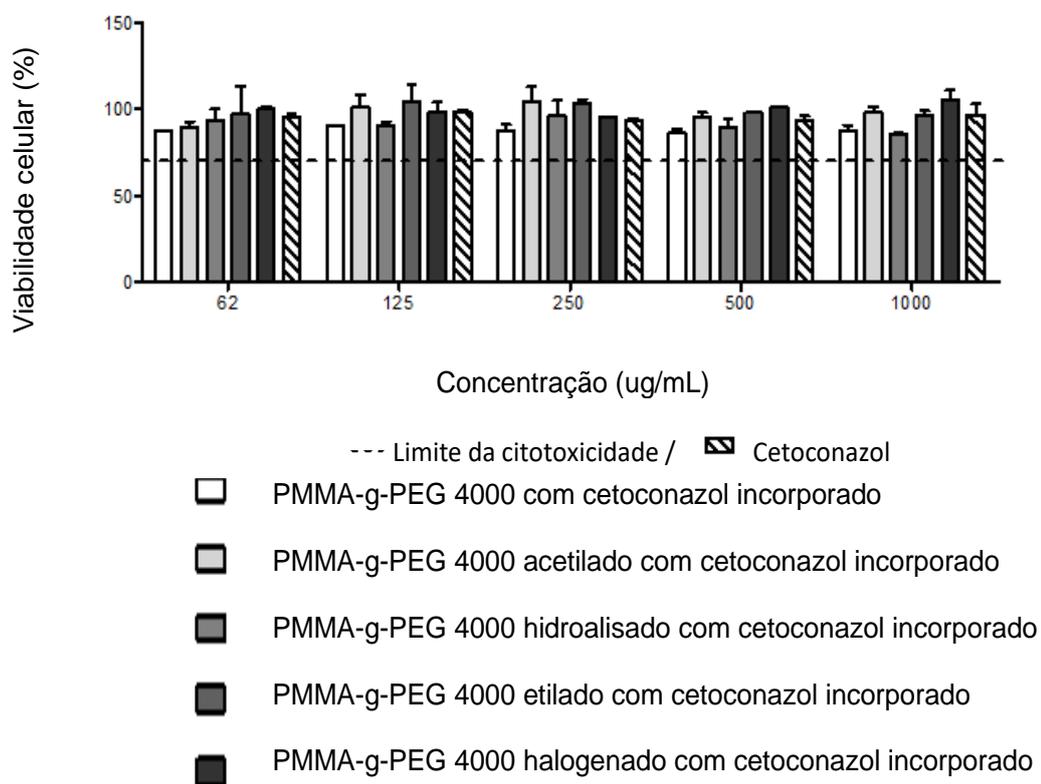
| Amostra | MIC (ug/mL) |
|----------------------------------------------------------|--------------------|
| Cetoconazol | 125 |
| PMMA-g-PEG 4000 com cetoconazol incorporado | 500 ^a |
| PMMA-g-PEG 4000 acetilado com cetoconazol incorporado | 1000 ^a |
| PMMA-g-PEG 4000 hidroalisado com cetoconazol incorporado | 500 ^a |
| PMMA-g-PEG 4000 etilado com cetoconazol incorporado | 500 ^a |
| PMMA-g-PEG 4000 halogenado com cetoconazol incorporado | 500 ^a |

Legenda: MIC = dosagem mínima inibitória em microgramas por mL

6.7 Viabilidade celular

De acordo com a ISO2009-10993-5 (avaliação biológica de dispositivos médicos), uma substância é considerada citotóxica quando a viabilidade celular é inferior a 70%. Portanto, os resultados obtidos no teste de citotoxicidade foram comparados de acordo com a ISO. O ensaio de sulforodamina B forneceu os dados relacionados aos copolímeros de acordo com a Figura 10. Com base nos resultados obtidos, observa-se que os copolímeros não são tóxicos em todas as concentrações testadas (62 a 1000 mg / L), uma vez que a viabilidade celular foi maior 70%, sendo considerada baixa toxicidade.

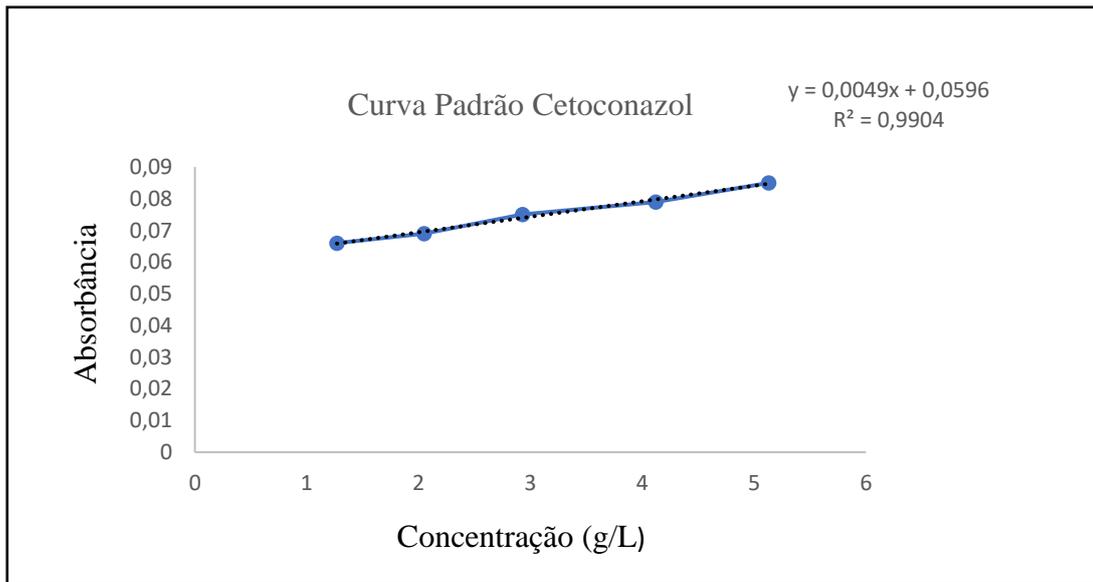
Figura 9 - Viabilidade celular com o fármaco cetoconazol e o PMMA-g-PEG 4000 e seus derivados



6.8 Curva Padrão

Os gráficos abaixo correspondem às curvas padrão obtidas a partir da leitura da absorbância em ultravioleta, no comprimento de onda de 225nm, das amostras diluídas dos cinco copolímeros.

Figura 10 - Curva padrão do fármaco cetoconazol

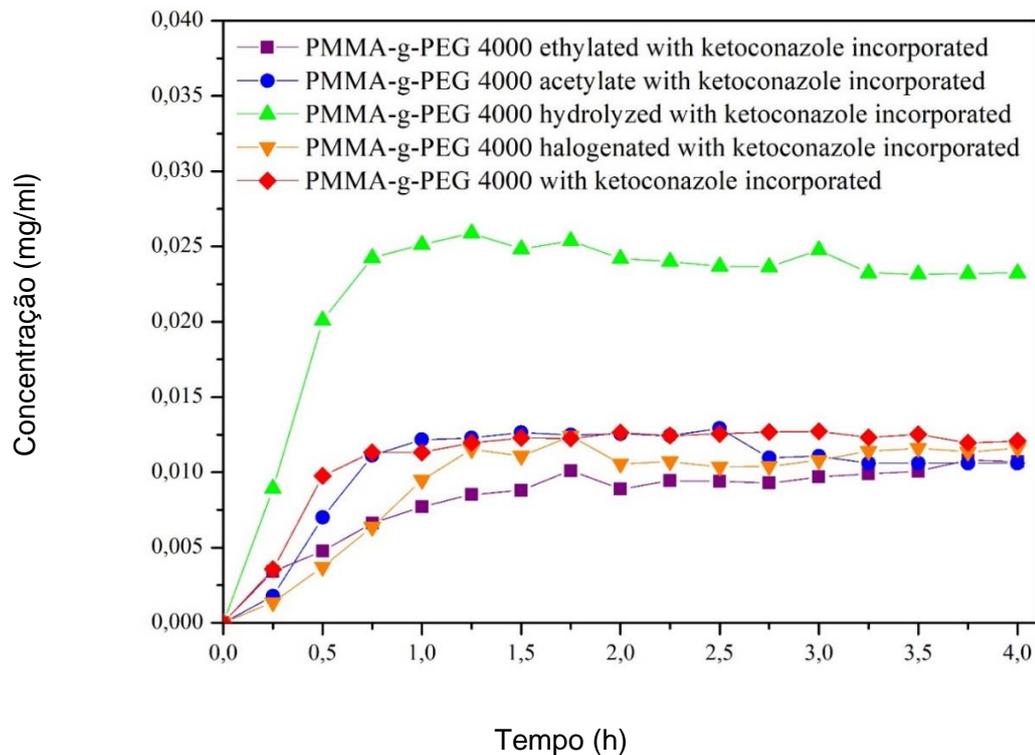


Durante a leitura das amostras no espectrofotômetro UV, foi feita uma varredura em ampla faixa de comprimentos de onda. Os maiores valores de absorbância foram obtidos em comprimento de onda de 225nm obtido pela varredura realizada na curva padrão.

6.9 Liberação Controlada

Após a caracterização, foi realizado o estudo de liberação controlada. PMMA-g-PEG e os modificados possuem perfil de liberação controlada (Fig. 11). Esta liberação controlada pode evitar os efeitos colaterais do cetoconazol devido. O PMMA-g-PEG 4000 hidrolisado apresentou maior liberação, atingindo a maior concentração máxima entre os copolímeros. Esse resultado pode ser devido à menor interação das cadeias desse copolímero com o fármaco.

Figura 11 - Curvas de liberação do cetoconazol a partir de cada copolímero modificado.



Legenda: PMMA-G-PEG 4000 etilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 acetilado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 hidrolisado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 halogenado incorporado com cetoconazol e PMMA-G-PEG 4000 incorporado com cetoconazol

O copolímero de origem e os derivados têm perfil de liberação (Figura 11). A partir das curvas de liberação obtidas no comprimento de onda de 225nm é possível avaliar o comportamento de cada copolímero modificado. O perfil de liberação que se espera é bimodal ou sigmoide e é caracterizado por lenta liberação na fase inicial seguido por aumento na liberação na fase posterior. Este tipo de perfil de liberação pode ser terapêuticamente benéfico para liberação controlada ou sítio-específico de fármacos. O PMMA-g-PEG 4000 com cetoconazol incorporado manteve a linearidade após a primeira hora e uma liberação inicial maior sendo o copolímero modificado e incorporado que mais se aproximou desse perfil esperado. Os outros copolímeros, PMMA-G-PEG 4000 halogenado incorporado com cetoconazol, PMMA-G-PEG 4000 incorporado com cetoconazol e PMMA-G-PEG 4000 acetilado incorporado com cetoconazol possuíram um perfil de liberação parecido, isso se deve à menor interação das cadeias desse copolímero com o fármaco, sendo mais presente no PMMA-G-PEG 4000 etilado incorporado com cetoconazol, que liberou mais rapidamente.

7- CONCLUSÃO

As incorporações do fármaco cetoconazol nas diferentes matrizes poliméricas, foram eficientes, com base nos resultados das caracterizações da AFM e IV, mostrando que o fármaco foi incorporado. Portanto, é possível afirmar que a incorporação foi realizada com sucesso, tendo sua característica em cada modificação diferente que foi refletida na liberação controlada, em que cada tipo de modificação do copolímero liberou em tempos diferentes dentro das quatro horas de liberação da matriz polimérica devido a interações entre as funções químicas adicionadas ao copolímero nas modificações e os grupos funcionais do fármaco cetoconazol. Além disso, na liberação controlada destaca-se o PMMA-g- O PEG 4000 HIDROL INCORP CETO, com o modelo de liberação sigmoidal, é caracterizado por lenta liberação na fase inicial seguido por aumento na liberação na fase posterior. E por fim, todos os copolímeros modificados apresentaram baixa atividade citotóxica, ficando acima dos 70% comprovando a viabilidade celular e quanto a atividade fungicida contra a *C. Albicans*, todos foram capazes de reduzir a MIC.

8- REFERÊNCIAS

- [1] AMPARO, R.T. **Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler**, 2016.
- [2] ANGER, R. & PEPPAS, N. A. - *AIChE J.*, 2003, 49, 2990.
- [3] BRUNTON, L. L. CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012.
- [4] DAMASCENO, B.P.G.L. **Sistema microemulsionado como carreador lipídico para fármacos insolúveis**. 2010.*Tese* (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.
- [5] DAMASCENO, B.P.G.L, *et tal.* *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2011, 2, 9.
- [6] DANTAS. S. N. A. **Estudos eletroanalíticos e mecanísticos de cetoconazol utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata (p-agsae)**, 2010
- [7] Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Módulo VII.
- [8] **Farmacopéia Brasileira 5ª edição**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Fundação Oswaldo Cruz, 2010
- [9] **FORMULÁRIO TERAPÊUTICO NACIONAL**: Rename 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- [10] FONSECA, A. PRISTA, N.L. **Manual de terapêutica dermatológica e Cosmetologia**. 2. ed. São Paulo: Roca Ltda., 2005.
- [11] ISO 10993-5:2009, edição 3.

- [12] JACOBS, I.C. MASON, N.S. **Polymer delivery systems concepts, in Polymeric delivery systems: properties and applications**, B. A. Charpentier, Editor, American Chemical Society: Washington, DC. 1993, 1.
- [13] LOPES. M. C. **Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos**, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2005.
- [14] LANZILLOTTI. P. F **Sistemas para liberação modificada de fármacos**, Fio Cruz, 2012.
- [15] MARTINDALE: **the complete drug reference**. SWEETMAN, S. C. (editor). 37. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011.
- [16] MAGALY A.M. DE LYRA, JOSÉ L. SOARES-SOBRINHO, Mariana T. BRASILEIRO, Mônica F. de La ROCA, Javier A. BARRAZA, Osni de S. VIANA, Pedro J. ROLIM-NETO, E.S.T. **Latin American Journal of Pharmacy**. 2007.
- [17] MENEZES. E. A. **Comparação da atividade de Antifúngicos Imidazólicos e Triazólicos frente a Candida Albicans**, 2016.
- [18] MORAES. S. M, **Tecnologia de vida longa**. Jornal da USP, 2007
- [19] PERARO, C. A. **Estabilidade Física e Metodologia Analítica para Formulações Farmacêuticas contendo Cetoconazol**. Dissertação (mestrado). 2001. – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- [20] RIOS, M. **Pharm. Technol.** 2005, 29, 42.
- [21] SWARBRICK, J. “*Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*”, Informa Healthcare, England 2007.
- [22] SANTOS R.M.V *et tal.* **Macromolecular Symposia** 2014, 343, 78.
- [23] SANTOS R.M.V. *et tal.* **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 2015, 25, 19.

- [24] VELOSO. P.P.I.M. **Anfotericina B, Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol – Uso Terapêutico e Efeito sobre o Sistema Imune.** 2010. Monografia – Faculdade de Ciências da saúde, Porto.
- [25] VILLANOVA J. C. O. *et tal.* **Aplicações farmacêuticas de polímeros,** Scielo, 2010.
- [26] VIÇOSA A. L. **Estudo da utilização de incrementadores de dissolução para compressão direta: enfoque no desenvolvimento de medicamentos genéricos,** Universidade Federal Do Rio De Janeiro, 2003.
- [27] ZHU, Y. **Properties of Polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion.** 2002. Tese (doutorado)- Faculty of the Graduate School of the University of Texas, Austin.