COPPE
Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
UFRJ

ENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE METILA) PARA O TRATAMENTO DE SINTOMAS DA COVID-19 E INFECÇÕES OPORTUNISTAS

Rodrigo Castro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Helen Conceção Ferraz
Martina Costa Cerqueira Pinto

Rio de Janeiro
Maio de 2025

ENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE METILA) PARA O TRATAMENTO DE SINTOMAS DA COVID-19 E INFECÇÕES OPORTUNISTAS

Rodrigo Castro

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Orientadores: Helen Conceção Ferraz
Martina Costa Cerqueira Pinto

Aprovada por: Prof. Eliane Pereira Cipolatti
Prof. Helen Conceção Ferraz
Prof. Martina Costa Cerqueira Pinto
Prof. Priscilla Vanessa Finotelli

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
MAIO DE 2025

Castro, Rodrigo

Encapsulamento de Fármacos em Nanopartículas Poliméricas de Poli(metacrilato de metila) Para o Tratamento de Sintomas da COVID-19 e Infecções Oportunistas/Rodrigo Castro. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2025.

XIV, 86 p.: il.; 29, 7cm.

Orientadores: Helen Conceção Ferraz

Martina Costa Cerqueira Pinto

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2025.

Referências Bibliográficas: p. 66 – 73.

1. Encapsulamento. 2. Nanopartículas Poliméricas. 3. Fármaco. I. Ferraz, Helen Conceção *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação de mestrado representa a realização de um grande sonho, e não seria possível sem o apoio incondicional de muitas pessoas que estiveram ao meu lado durante esta jornada. Gostaria de dedicar este momento para expressar minha profunda gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Primeiramente, agradeço à minha mãe, pela força, paciência e amor infinitos que sempre me ofereceu. Sua presença foi fundamental em cada passo dessa caminhada, e seu apoio constante foi a base que me sustentou nos momentos mais desafiadores. Agradeço também à minha irmã e à minha sobrinha, que com suas risadas e carinho, tornaram minha vida mais leve e me motivaram a seguir em frente, mesmo nas horas mais difíceis. O amor da minha família foi o combustível que me impulsionou a não desistir e a continuar acreditando em mim.

Agradeço ao meu melhor amigo, Victor Alves, por ser a pessoa que sempre acreditou em mim antes mesmo de eu acreditar em mim mesmo. Victor foi quem me incentivou a me inscrever no mestrado e nunca deixou de me apoiar, seja nos momentos de dúvida ou nas celebrações das pequenas conquistas ao longo do percurso. Sua amizade e apoio foram fundamentais para minha perseverança.

Por fim, sou imensamente grato às minhas orientadoras, que me conduziram com sabedoria, paciência e zelo durante toda a pesquisa. Suas orientações precisas e seu olhar atento foram cruciais para que eu pudesse amadurecer intelectualmente e alcançar os objetivos que me propus. O aprendizado adquirido com elas é inestimável e será levado comigo em minha trajetória profissional e pessoal.

A todos vocês, meu mais sincero agradecimento. Este trabalho é, sem dúvida, fruto do apoio, da amizade e do amor que recebi ao longo dessa jornada.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE METILA) PARA O TRATAMENTO DE SINTOMAS DA COVID-19 E INFECÇÕES OPORTUNISTAS

Rodrigo Castro

Maio/2025

Orientadores: Helen Conceção Ferraz
Martina Costa Cerqueira Pinto

Programa: Engenharia Química

Desde o início do ano de 2020, a fragilidade mundial diante da pandemia causada pelo coronavírus (COVID-19) evidencia a necessidade de desenvolver novos fármacos e novos sistemas para tratamento de doenças virais. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi a síntese de nanopartículas poliméricas contendo fármacos encapsulados (fármacos com ação contra sintomas de COVID-19 e contra infecções oportunistas). Mais especificamente, o foco principal do trabalho foi o encapsulamento dos fármacos azitromicina (empregado no combate a infecções oportunistas) e naproxeno (utilizado no combate aos sintomas de COVID-19) em nanopartículas poliméricas à base de poli(metacrilato de metila) (PMMA), explorando a ténica de polimerização em miniemulsão. Foram avaliados os efeitos dos teores de fármaco e surfactante na cinética de polimerização e na morfologia das partículas, e realizados estudos de liberação de tais compostos. Foi possível perceber que as diferentes condições reacionais resultaram em partículas em escala nanométrica, com diâmetros adequados para aplicações na área farmacêutica. Notou-se que o aumento de teor de azitromicina provocou o aumento do número de partículas de maior diâmetro, possivelmente em função de uma maior aglomeração de partículas. Percebeu-se que a adição de naproxeno não interferiu de maneira significativa na cinética da reação e no diâmetro de partícula. Foi possível notar, quantitativamente, que houve a liberação da azitromicina das nanopartículas ao longo do tempo de ensaio. Para o naproxeno, a liberação foi de aproximadamente 40% do fármaco após 6h. Dessa

forma, percebe-se a relevância tecnológica, científica e de saúde pública do tema e o grande potencial de aplicação dos nanosistemas produzidos.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ENCAPSULATION OF DRUGS IN POLYMERIC NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF COVID-19 SYMPTOMS AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS

Rodrigo Castro

May/2025

Advisors: Helen Conceção Ferraz
Martina Costa Cerqueira Pinto

Department: Chemical Engineering

Since the beginning of 2020, the global fragility in the face of the pandemic caused by the coronavirus (COVID-19) highlights the need to develop new medicines and new systems for treating viral diseases. In this context, the objective of the present work was the production of polymeric nanoparticles containing encapsulated medicines (drugs with action against the symptoms of COVID-19 and opportunistic infections). More specifically, the main focus of the work was the encapsulation of the drugs azithromycin (used to combat opportunistic infections) and naproxen (used to combat the symptoms of COVID-19) in polymeric nanoparticles based on poly(methyl methacrylate) (PMMA), exploring the miniemulsion polymerization technique. The effects of drug and surfactant contents on polymerization kinetics and particle morphology were evaluated, and release essays were also carried out. It was possible to notice that different reaction conditions resulted in nanometer-scale particles, facilitating applications in the pharmaceutical area. It was noted that the increase in azithromycin content caused an increase in larger diameter particles, possibly due to greater particle agglomeration. It was also noticed that adding naproxen did not significantly interfere with the kinetics of occurrence and particle diameter. It was possible to observe, qualitatively, the release of azithromycin over time. For naproxen, approximately 40% of the drug was released after 6 hours of testing. In this way, it is evident the technological, scientific, and public health relevance of the topic and the great potential for application of the produced nanosystems.

Sumário

Lista de Figuras **x**

Lista de Tabelas **xiv**

1 Introdução **1**

1.1 Introdução 1

1.2 Objetivos 3

2 Revisão Bibliográfica **5**

2.1 Revisão Bibliométrica 5

2.2 Nanocarreadores 11

2.3 Métodos de Síntese de Nanopartículas Poliméricas 14

2.3.1 Polimerização em Emulsão 14

2.4 Síntese de Nanopartículas Poliméricas de PMMA Contendo Ativos Encapsulados 18

2.5 Azitromicina 19

2.6 Naproxeno 21

2.7 Considerações Finais 22

3 Materiais e Métodos **24**

3.1 Materiais empregados nas reações de polimerização e análises de caracterização 24

3.2 Síntese de nanopartículas de PMMA contendo fármacos encapsulados 24

3.3 Avaliação do Efeito da Concentração de Surfactante e de Fármaco . . 26

3.4 Análise Estatística 27

3.5 Conversão 28

3.6 Distribuição de Tamanhos de Partícula 28

3.7 Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 29

3.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 29

3.9 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) 30

3.10 Análise Termogravimétrica (TGA) 30

3.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 30

3.12 Teste de Liberação 31

4 Resultados **32**

4.1 Encapsulamento da Azitromicina 32

4.1.1 Influência na Conversão 32

4.1.2 Influência na Morfologia 34

4.1.3 Influência na Composição das Nanopartículas Poliméricas . . . 42

4.1.4 Eficiência de Encapsulamento da Azitromicina nas Nanopartículas de PMMA 46

4.1.5 Ensaio de Liberação 48

4.2 Encapsulamento do Naproxeno 50

4.2.1 Influência na Conversão 50

4.2.2 Influência na Morfologia 52

4.2.3 Influência na Composição das Nanopartículas Poliméricas . . . 55

4.2.4 Eficiência de Encapsulamento do Naproxeno nas Nanopartículas de PMMA 58

4.2.5 Ensaios de Liberação 60

4.3 Comparação dos Fármacos 60

4.4 Considerações Finais 63

5 Conclusão e Sugestões **64**

5.1 Sugestões 65

Referências Bibliográficas **66**

Anexo A **74**

Anexo B **76**

Anexo C **78**

Anexo D **81**

Lista de Figuras

2.1 Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*"e "drug". 6
2.2 Número de publicações ao longo dos anos por área do conhecimento, empregando como termos de busca "encapsulat*"e "drug. 7
2.3 Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*", "drug"e “polymer*”. 8
2.4 Número de publicações ao longo dos anos por área do conhecimento, empregando como termos de busca "encapsulat*", "drug e “polymer*”. 8
2.5 Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*"e “azithromycin”. 9
2.6 Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*", “azithromycin” e “polymer”. 10
2.7 Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*” e “naproxen”. 10
2.8 Alguns tipos de nanocarreadores [1]. 12
2.9 Morfologia de nanopartículas encapsuladas com fármaco: nanocápsulas e nanoesferas [2]. 13
2.10 Estrutura molecular da Azitromicina [3]. 19
2.11 Estrutura molecular do Naproxeno [4]. 21

4.1 Cinética de polimerização do MMA na presença da azitromicina no ponto central. 32
4.2 Conversão do MMA ao longo do tempo, no plano experimental à base de azitromicina. 33
4.3 Micrografias das partículas produzidas nos experimentos do ponto central: (a) experimento 1, 20.000x; (b) expermento 2, 20.000x; (c) experimento 3, 20.000x; (d) experimento 1, 50.000x; (e) expermento 2, 50.000x; (f) experimento 3, 50.000x. 35

4.4 Micrografias das partículas produzidas em cada uma das condições do plano experimental: (a) experimento 4, 20.000x; (b) experimento 4, 50.000x; (c) experimento 5, 20.000x; (d) experimento 5, 50.000x; (e) experimento 6, 20.000x; (f) experimento 6, 50.000x; (g) experimento 7, 20.000x; (h) experimento 7, 50.000x. 38
4.5 Distribuição de tamanhos de partícula do plano experimental à base de azitromicina e dos experimentos do ponto Central. 38
4.6 Fotografia dos aglomerados obtidos ao final do experimento 6. 39
4.7 Diâmetros médios dos experimentos do ponto central: (a) diâmetros médios até 60 minutos; (b) diâmetros médios até 120 minutos. 40
4.8 Diâmetros médios de partícula dos materiais produzidos a partir dos experimentos do plano e ponto central: (a) após 60 min de reação; (b) após 120min de reação. 41
4.9 Espectros de FTIR das amostras produzidas na presença de azitromicina: (a) espectros de cada um dos experimentos; (b) correlação entre as intensidades dos picos de cada um dos espectros dos materiais e as intensidades dos picos do PMMA puro; (c) correlação entre as intensidades dos picos dos espectros dos materiais e as intensidades dos picos do PMMA puro excluindo a Azitromicina. 43
4.10 Distribuição de tamanhos das cadeias poliméricas das nanopartículas contendo azitromicina. 44
4.11 Análise termogravimétrica das nanopartículas produzidas na presença de azitromicina 46
4.12 Metila A da Azitromicina. 47
4.13 Espectro de RMN do PMMA puro. 47
4.14 Espectros de RMN das amostras de azitromicina: (a) experimento +1/+1; (b) experimento -1/-1. 48
4.15 Avaliação da faixa de absorção no UV da azitromicina em diferentes comprimentos de onda, em diferentes concentrações do fármaco. . . . 49
4.16 Perfis de liberação da azitromicina da matriz de PMMA ao longo das 5h de experimento. 50
4.17 Cinética de polimerização do MMA na presença de naproxeno no ponto central. 50
4.18 Conversões do plano experimental à base de naproxeno. 51
4.19 Micrografias das partículas produzidas nos experimentos do ponto central: (a) experimento 1, 20.000x; (b) expermento 2, 20.000x; (c) experimento 3, 20.000x. 52

4.20 Micrografias das partículas produzidas em cada uma das condições do plano experimental: (a) experimento (-1/+1), 20.000x; (b) experimento (+1/+1), 20.000x; (c) experimento (-1/-1), 20.000x; (d) experimento (+1/-1), 20.000x. 53
4.22 Diâmetros médios das nanopartículas produzidas a partir dos experimentos do ponto central. 54
4.21 Distribuição de tamanhos de partícula do plano experimental à base de naproxeno e dos experimentos do ponto central. 54
4.23 Diâmetros médios de partícula dos materiais produzidos a partir dos experimentos do plano experimental e ponto central, na presença de naproxeno. 55
4.24 Espectros de FTIR das amostras produzidas na presença de naproxeno: (a) espectros de naproxeno e PMMA; (a) espectros de cada um dos experimentos; (b) correlação entre as intensidades dos picos de cada um dos espectros dos materiais e as intensidades dos picos do PMMA puro. 56
4.25 (a) correlação entre as intensidades dos picos dos materiais e do PMMA puro; (b) correlação entre as intensidades dos picos dos materias e do PMMA puro excluindo o naproxeno 56
4.26 Distribuição de tamanhos das cadeias poliméricas das nanopartículas contendo naproxeno. 57
4.27 Análise termogravimétrica das nanopartículas produzidas na presença de naproxeno. 58
4.28 Metila A do naproxeno. 59
4.29 Espectros de RMN das amostras de naproxeno. 59
4.30 Perfil de liberação do naproxeno da matriz de PMMA ao longo das 6h 60
4.31 Comparação da cinética de polimerização do MMA na presença de azitromicina e naproxeno. 61
4.32 Comparação das distribuições de tamanhos de partícula dos materiais contendo azitromicina e naproxeno. 62
4.33 Comparação dos diâmetros médios de partícula dos materiais contendo azitromicina e naproxeno. 62

1 Espectros de FTIR dos materiais produzidos:(a) Espectro do PMMA, (b) Espectro da Azitromicina, (c) Espectro do Experimento 1, (d) Espectro do Experimento 2, (e) Espectro do Experimento 3 78
2 Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Experimento 4, (b) Experimento 5, (c) Experimento 6, (d) Experimento 7. 79

3 Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Espectro do PMMA, (b) Espectro do Naproxeno. 79
4 Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Experimento 1, (b) Experimento 2 e (c) Experimento 3. 80
5 Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Experimento 4, (b) Experimento 5, (c) Experimento 6 e (d) Experimento 7. 80
6 Dissolutor usado nos ensaios de liberação dos fármacos. 81
8 Perfis de liberação ao longo do tempo de experimento. 82
7 Avaliação da faixa de absorção no UV da azitromicina em diferentes comprimentos de onda, em diferentes concentrações do fármaco. . . . 82
9 Espectros das diluições de naproxeno. 83
10 Curva analítica subtraindo o valor do tampão. 84
11 Curva de liberação do Naproxeno ao longo do tempo. 84
12 Curva de liberação do naproxeno ao longo do tempo. 86

Lista de Tabelas

2.1 Principais características dos tipos de emulsão[5] 15
2.2 Trabalhos de Encapsulamento de Fármacos Desenvolvidos pelo Grupo empregando PMMA como matriz polimérica. 19

3.1 Massa dos Componentes de cada Reação 25
3.2 Massa dos Componentes de cada Reação 25
3.3 Plano experimental completo associado ao encapsulamento da azitromicina 26
3.4 Plano experimental completo completo associado ao encapsulamento do naproxeno. 27

4.1 Massas molares médias (Mn e Mw) e Índice de Polidispersão (PDI). . 45
4.2 Massas molares médias (Mn e Mw) e Índice de Polidispersão (PDI). . 57

1 Conversões dos Experimentos Centrais. 74
2 Conversões dos Experimentos do Plano da Azitromicina. 74
3 Conversão do PMMA puro. 75
4 Conversões dos Experimentos Centrais. 75
5 Conversões dos Experimentos do Plano do Naproxeno. 75
6 Diâmetro Médio e Média dos Experimentos Centrais. 76
7 Diâmetro Médio dos Experimentos do Plano da Azitromicina. 76
8 Diâmetro Médio e Média dos Experimentos Centrais. 77
9 Diâmetro Médio dos Experimentos do Plano do Naproxeno. 77
10 Concentração das diluições do fármaco preparadas. 83
11 Absorbâncias máximas associadas a cada concentração avaliada. . . . 84
12 Triplicata do teste de dissolução do naproxeno. 85
13 Percentual de Naproxeno liberado. 85

Capítulo 1

Introdução

1.1 Introdução

Em dezembro de 2019, surgiu o primeiro caso de uma doença que trouxe impactos socioeconômicos profundos à população mundial: a COVID-19. Desde o primeiro caso, o vírus, conhecido como SARS-CoV2, se espalhou rapidamente de Wuham, na China, para todos os demais continentes [6]. A altíssima velocidade de espalhamento de tal vírus no globo fez com que, em 12 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarasse o início de uma pandemia [7] . De acordo com os registros da plataforma da OMS, no dia 22 de abril de 2022, a severidade de tal doença poderia ser percebida ao se deparar com os mais de 500 milhões de casos reportados, com mais de 6 milhões de mortes causadas pela doença ao redor do mundo [7].

Paralelamente, a comunidade científica travava uma batalha contra o SARS-CoV2. Desde o momento em que a existência de tal vírus foi detectada, especialistas de diversas áreas do conhecimento sde uniram e direcionaram seus esforços para o desenvolvimento de novas tecnologias para o combate direto ou indireto ao vírus. Inicialmente, as medidas de proteção individual eram as únicas realmente eficazes, como o uso de máscaras, distanciamento social e intensificação da higienização das mãos. Entretanto, mesmo com a adoção de tais medidas, observou-se o crescimento progessivo e acentuado de pessoas doentes e hospitalizadas. No Brasil e em muitos países do mundo, tal crescimento levou à superlotação das unidades de tratamento intensivo (UTI) e ao colapso no sistema de saúde.

Nesse cenário trágico, o desenvolvimento das vacinas foi crucial para o combate à pandemia, resultando na redução significativa do número de casos e de mortes e culminando na declaração de fim da pandemia, em 05 de maio de 2023 [8].

Vale ressaltar que o SARS-CoV2 não foi o primeiro coronavírus que se espalhou e infectou pessoas. Em 2003, ocorreu a epidemia de Severe Acute Respiratory Syn-

drome Coronavirus (SARS-CoV), a qual foi responsável pela infecção de cerca de 8.000 pessoas, com pouco menos de 800 mortes ao redor do mundo. Houve também, em 2012, o Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, sendo responsável por aproximadamente 2.494 casos, sendo 858 letais . Assim, ao comparar com os vírus pré- existentes, o SARS- CoV2 destaca-se pela altíssima transmissibilidade e gravidade do quadro da doença, apesar da menor taxa de letalidade [9]

Há muitos medicamentos efecientes para o combate a vírus e a outros agentes patogênicos, como bactérias. Contudo, os métodos tradicionais de administração de medicamentos, muitas vezes, apresentam baixa eficácia, devido a grandes perdas dos princípios ativos provocadas por variações de pH e por ação de enzimas do próprio organismo. Além disso, alguns tratamentos de longa duração requerem aplicações frequentes do medicamento para garantir a manutenção de concentrações mínimas do composto no sangue, em função da rápida excreção do fármaco. Como consequência, muitas vezes há necessidade de administrar dosagens maiores do medicamento para que seja efetivo, o que pode provocar diversos efeitos colaterais [10].

Nesse contexto, uma tecnologia que se destaca tanto na academia quanto na indústria é o encapsulamento de fármacos em micro e nanopartículas. Tal tecnologia possibilita a redução da degradação do fármaco no organismo, permite um maior controle na liberação dos componentes a valores próximos do ideal terapêutico, possi- bilita a redução de efeitos colaterais e o aumento da biodisponibilidade do fármaco, diminuindo a frequência de administrações. Ademais, é possível adsorver, na superfície de tais partículas, biomoléculas que possuam interações es- pecíficas com ligantes de uma célula, permitindo a interação com o alvo de atuação. Na área médica, por exemplo, as micro e nanopartículas funcionalizadas vêm sendo empregadas ainda para vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos, com o propósito de promover uma distribuição mais seletiva desses compostos, re-sultando em aumento do índice terapêutico [11].

Contudo, um material para ser utilizado como veículo carreador de fármaco,deve apresentar características específicas, como facilidade de preparação, tamanho de partículas reduzido, alta capacidade de absorção do fármaco desejado, liberação gradual do fármaco e, ao menos idealmente, ação local apenas nas células ou órgãos doentes, onde se almeja realizar o tratamento [12]. Dentre as partículas carreadoras de fármacos, os lipossomos, as micelas e as partículas poliméricas são os mais estudados. Assim, atualmente, uma área de intensa pesquisa e desenvolvimento tecnológico engloba justamente o estudo aprofundado e a síntese de novas micropartículas e nanopartículas poliméricas empregadas como carreadores de ativos [12, 13].

Diante do exposto, o poli(metacrilato de metila) (PMMA) destaca-se como potencial material para o encapsulamento de ativos. O PMMA apresenta excelente biocompatibilidade, facilidade de manipulação e propriedades como transparência

e elevada resistência à compressão, características essas que fazem com que este polímero seja largamente utilizado em aplicações odontológicas e biomédicas, sendo empregados em sistemas de liberação de fármacos, na fabricação de bombas de sangue, membranas para diálise de sangue e diagnósticos *in vitro*, próteses oculares e lentes de contato. Além disso, vem sendo utlizado também no encapsulamento de diferentes ativos, apresentando especia l aplicação nas áreas farmacêutica e médica [14].

No cenário de pandemia, diversos fármacos com potencial farmacológico vêm sendo estudados na tentativa de combater os sintomas de COVID-19 e das doenças oportunistas que surgem, incluindo azitromicina e, naproxeno [15–18]. A azitromicina é um antibiótico de largo espectro, usado para tratar inúmeras doenças respiratórias [19]; já o naproxeno é um anti-inflamatório amplamente empregado no tratamento de doenças reumáticas e articulares [20]. Apesar de nenhum resultado conclusivo ter sido apresentado até o momento, alguns trabalhos da literatura científica apontam a potencial eficácia do uso de tais fármacos no tratamento do COVID-19 e de outras doenças secundárias provocadas pelo vírus [21, 22]. Contudo, é importante destacar que a administração de altas doses desses fármacos provocam diversos efeitos colaterais, como náusea, dores abdominais, arritmias, problemas cardíacos, hemorragias podendo, inclusive, levar o paciente a óbito.

Por tudo que vem sendo analisado na literatura-técnico científica, é evidente a necessidade de desenvolver novos nanosistemas sítio-dirigidos mais eficazes e que utilizem menores doses de ativos voltados para o combate ao SARS-CoV2. Dessa forma, busca-se com o presente trabalho encapsular fármacos modelo que apresentem potencial farmacológico contra o vírus SARS-CoV2 ou que sejam empregados no tratamento de infecções oportunistas. Adicionalmente, os avanços obtidos com esse desenvolvimentos podem ser posteriormente adaptados para aplicação como estratégia de tratamento em prováveis futuras pandemias.

1.2 Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi a produção de nanopartículas poliméricas biocompatíveis contendo fármacos encapsulados para tratamento do COVID-19 e contra infecções oportunistas.

Como objetivos específicos, tem-se:

- Encapsulamento dos fármacos azitromicina (empregado no combate de infecções oportunistas) e naproxeno (utilizado no combate aos sintomas de COVID-19) em nanopartículas poliméricas à base de poli(metacrilato de me-

tila)(PMMA);

- Explorar a técnica de polimerização em miniemulsão;
- Avaliar os efeitos de variáveis operacionais (teor de fármaco e surfactante) na cinética de polimerização e na morfologia das partículas, com destaque para a conversão monomérica e o diâmetro médio das partículas produzidas.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será apresentado o estado da arte para o embasamento dos diferentes aspectos relacionados ao trabalho, destacando-se os principais tipos de carreadores estudados atualmente, os principais métodos para síntese de nanopartículas poliméricas, os principais estudos englobando o emprego do PMMA no encapsulamento de ativos e, por fim, os principais trabalhos envolvendo azitromicina e naproxeno. Nesse âmbito, realizou-se inicialmente uma análise bibliométrica exploratória, de maneira a avaliar a produção científica relacionada ao encapsulamento de fármacos, utilizando-se a base de dados *Web of Science*. Dessa forma, foi possível identificar as lacunas do ponto de vista científico ainda existentes sobre este tema e os desafios que precisam ser estudados de maneira mais aprofundada na literatura técnico-científica.

2.1 Revisão Bibliométrica

Para conduzir uma revisão bibliométrica exploratória foi utilizada a plataforma *Web Of Science* (WoS), no dia 18 de novembro de 2024, com objetivo de avaliar o número de publicações ao longo dos anos e por área e compreender a trajetória do conhecimento sobre o desenvolvimento de fármacos encapsulados em nanopartículas poliméricas. Nesse sentido, iniciou-se a análise a partir de buscas mais gerais, empregando os termos "encapsulat*"e "drug", e, em seguida "encapsulat*", "drug e "polymer*". Tais palavras foram buscadas na área "tópicos", que abrange o título, o resumo e as palavras-chave dos artigos publicados até a data da pesquisa. É importante ressaltar que os artigos de revisão foram excluídos das buscas.

Foram encontradas, então, 53.249 publicações empregando os termos "Encapsulat*"e "drug". O elevado número de publicações já era esperado, uma vez que muitos estudos têm sido conduzidos na área de encapsulamento de fármacos, buscando-se desenvolver medicamentos mais eficientes, como mencionado no capítulo anterior. A Figura 2.1 apresenta justamente o aumento do número de artigos publicados

sobre esse tema ao longo dos últimos 20 anos. No ano de 2020, por exemplo, a quantidade de publicações foi maior que o dobro das publicações do ano de 2013. Esse crescimento destaca o interesse científico relacionado ao encapsulamento de fármacos. O ano de 2024, mesmo a pesquisa sendo conduzida em novembro, já se destaca como um dos anos em que houve o maior número de publicações sobre o tema.

Figura 2.1: Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*"e "drug".

O panorama da distribuição das publicações entre as diferentes áreas científicas pode ser observado na Figura 2.2. É possível notar o destaque das áreas de farmácia e farmacologia, totalizando 16.039 artigos, aproximadamente 30% do total de publicações sobre encapsulamento de medicamentos. Em seguida, destaca-se a área de Química Multidisciplinar, correspondendo a 9.916 artigos, possivelmente em função da busca da ciência pela síntese de novos materiais e novos estudos de funcionalização. Desponta-se, então, a área de Nanotecnologia e Nanociência, que ocupa a terceira posição, ressaltando a importância dos nanoma- teriais para a aplicação em encapsulamento de fármacos.

Figura 2.2: Número de publicações ao longo dos anos por área do conhecimento, empregando como termos de busca "encapsulat*"e "drug.

Na busca seguinte, foi inserido o termo "polymer*", resultando em 19.112 publicações. A inclusão deste termo representou uma queda de aproximadamente 60% no número de estudos, ao comparar com a busca anterior, uma vez que diferentes estruturas e materiais são utilizados no processo de encapsulamento de ativos, e não apenas materiais poliméricos. Contudo, ao observar a Figura 2.3, percebe-se também o aumento do número de trabalhos publicados por ano entre os anos de 2006 e 2024, ressaltando a importância do tema e a busca por novos sistemas e materiais mais eficientes. É importante ressaltar que, embora fosse esperado um salto de publicações maior no ano de 2020 por conta do cenário pandêmico, o processo de pesquisa para posterior publicação foi diluído ao longo dos anos de 2020 a 2023, seguido por uma queda suave no ano de 2024, quando a pandemia já havia acabado.

Figura 2.3: Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*", "drug"e “polymer*”.

Apesar do crescente interesse pela técnica de encapsulamento e das características muito versáteis das matrizes poliméricas, percebe-se que ainda são necessários avanços técnico-científicos na área, já que há diferentes tipos de materiais poliméricos que podem ser explorados, inúmeros fármacos com potencial de serem encapsulados em matrizes poliméricas e há um surgimento crescente de técnicas cada vez mais específicas de encapsulamento.

Nesse cenário, as principais áreas científicas são mostradas na Figura 2.4. É possível notar que as duas áreas de destaque são exatamente as mesmas encontradas na busca anterior (áreas da farmácia e farmacologia e área da química multidisciplinar). Na terceira posição desponta a área da Ciência de Polímeros, com 3.509 artigos.

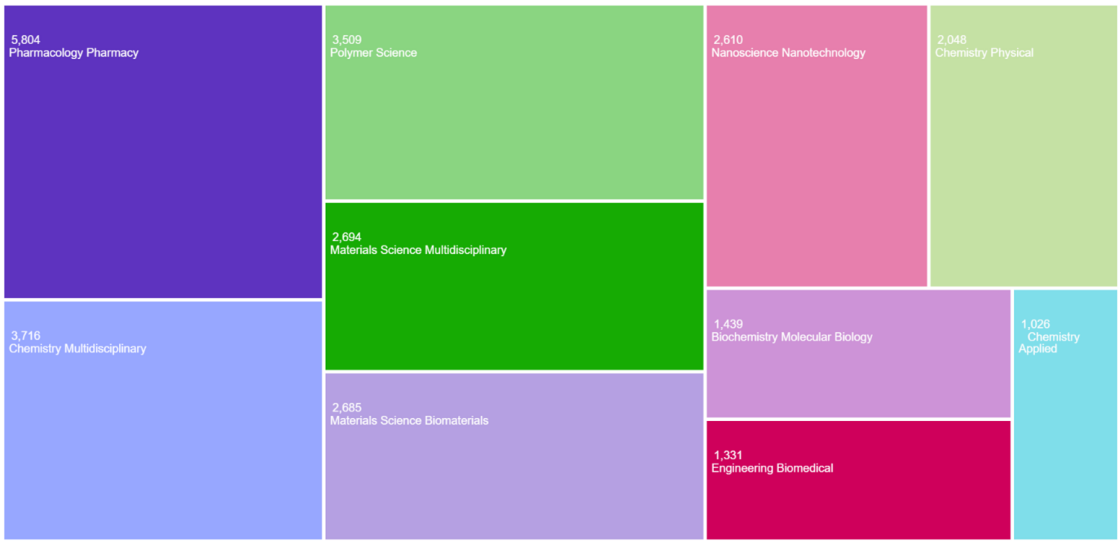


Figura 2.4: Número de publicações ao longo dos anos por área do conhecimento, empregando como termos de busca "encapsulat*", "drug e “polymer*”.

Por fim, foram conduzidas buscas mais específicas, com enfoque para os fármacos utilizados no presente trabalho: a azitromicina e o naproxeno. Assim, os termos da terceira busca, mais restrita por conta da especificidade de cada fármaco, foram "encapsulat*"e "azithromycin", sendo encontrados 83 artigos. Apesar da restrição mencionada, é surpreendente a reduzida quantidade de publicações relacionadas ao tema, uma vez que a azitromicina é um dos antibióticos mais empregados no combate a infecções. De acordo com uma busca feita no PubMed com o termo "azithromycin", há um total de 14.505 publicações, mostrando que é um medicamento muito difundido na literatura biomédica. A Figura 2.5 apresenta o número crescente de publicações sobre este medicamento ao longo dos últimos 10 anos, sendo observado que o número de publicações relacionadas ao tema ao longo dos anos permanece baixo, em torno de 10 publicações por ano.

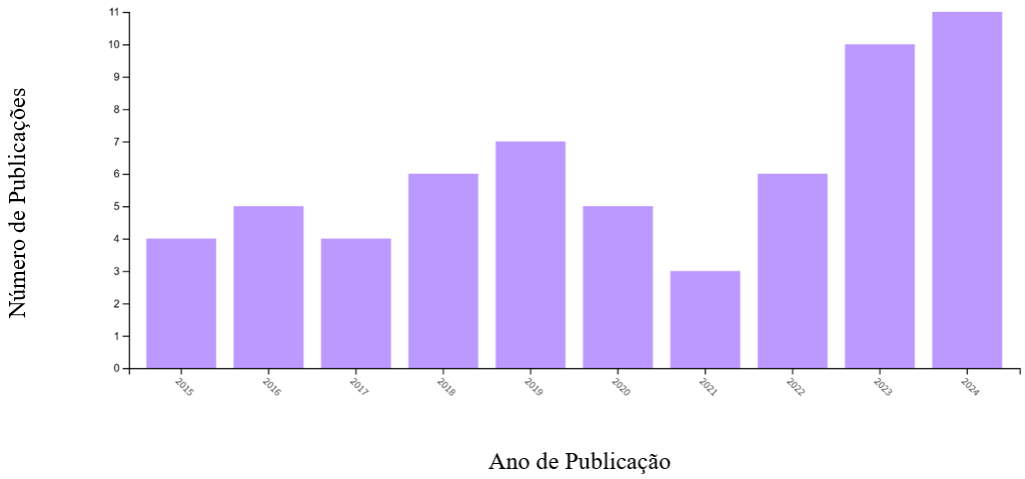


Figura 2.5: Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*"e “azithromycin”.

Ao restringir ainda mais a busca, almejando-se avaliar os trabalhos envolvendo polímeros, foi inserido o termo "polymer". Nesse caso, foram encontrados 21 artigos, distribuídos ao longo dos anos, como mostra a Figura 2.6. A quantidade reduzida de estudos ressalta as lacunas no campo científico sobre o encapsulamento de azitromicina em partículas poliméricas, atingindo, no máximo, 3 publicações por ano. Ao avaliar tais artigos, percebe-se que a maior parte envolve o encapsulamento da azitromicina em outros polímeros por evaporação de solvente. Poucos trabalhos englobam o encapsulamento da azitromicina em estruturas do tipo lipossomas. Nenhum dos artigos encontrados empregou a técnica de polimerização em miniemulsão, nem utilizou o polimetacrilato de metila como matriz encapsulante. Nota-se também que, todas as publicações sobre este tema são recentes, a primeira publicação data do ano de 2011. Diante de tais números, comprova-se que o de-

senvolvimento científico relacionado ao encapsulamento da azitromicina em polímeros é recente e há muitos aspectos a serem estudados e aprofundados; ainda mais ao comparar com os números já apresentados na segunda busca envolvendo apenas "drugs", correspondendo a 19.112 publicações.

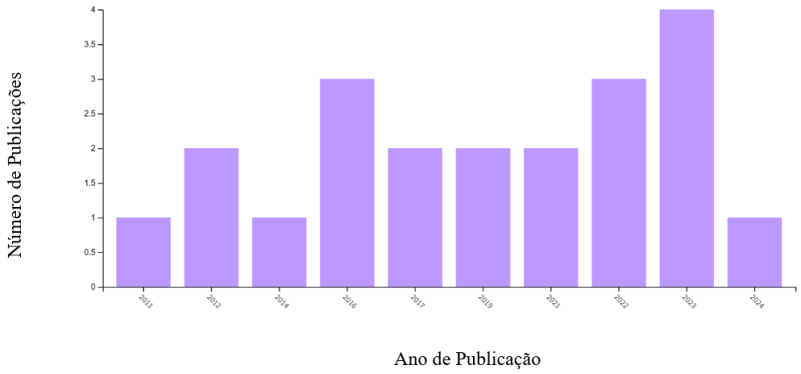


Figura 2.6: Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*", “azithromycin” e “polymer”.

Buscas mais específicas também foram conduzidas de maneira a avaliar os estudos focados no naproxeno. Assim, os termos que foram empregados na pesquisa foram "encapsulat*"e "naproxen", sendo encontrados 199 artigos publicados ao longo dos anos, um número mais alto quando se compara à terceira busca, realizada sobre a azitromicina. A Figura 2.7 apresenta a distribuição do número de publicações ao longo dos anos. Percebe-se que houve um crescimento no número de publicações nas últimas duas décadas, o que sugere um interesse científico maior relacionando os termos buscados. Ao buscar por trabalhos empregando as palavras-chave "encapsulat*"e "naproxen"e “polymer*”, apenas 76 artigos foram encontrados. Entretanto, não foi verificada a existência de publicações que se assemelhem com a proposta deste trabalho, o encapsulamento *in situ* do naproxeno.

Figura 2.7: Número de publicações ao longo dos anos empregando como termos de busca "encapsulat*” e “naproxen”.

Dessa forma, após a realização das diversas buscas apresentadas anteriormente, é possível perceber a relevância da presente proposta de pesquisa, visto que não há artigos que envolvam o encapsulamento *in situ* em PMMA da azitromicina e do naproxeno. Por tudo que foi apresentado, ressalta-se a grande importância deste trabalho para o combate tanto a doenças associadas diretamente ao COVID, quanto a outras doenças que possam ser tratadas a partir dos nanomedicamentos de azitromicina e naproxeno.

2.2 Nanocarreadores

A nanotecnologia é uma ciência intrinsecamente multidisciplinar e seu desenvolvimento resulta na geração de novas técnicas e tecnologias que encontram aplicação em diversas áreas do conhecimento, como na farmácia, na medicina, na área de cosméticos [23]. A nanomedicina, inovação proporcionada pela nanotecnologia, envolve principalmente ensaios para diagnóstico e tratamento , proporcionados por carreadores em nanoescala [24]. Especificamente na área farmacêutica, o setor de *drug delivery*, ou direcionamento inteligente de medicamentos, é, provavelmente, uma das subáreas mais relacionadas à nanotecnologia. O direcionamento dos medicamentos é dito inteligente, porque o objetivo é levar um ativo, que pode ser um medicamento ou um agente de contraste, uma proteína ou um ácido nucleico, especificamente a um local de atuação, seja para tratamento, seja para diagnóstico, ou qualquer outro objetivo [23, 24]. E para tal utilizam-se os chamados nanocarreadores.

Além da principal função do uso de nanocarreadores ser justamente a liberação sítio-dirigida, há muitos outros benefícios que advém do carreamento inteligente. Pode-se citar, por exemplo, a liberação controlada de tal ativo, a redução de dosagem (uma vez que a liberação controlada garante a manutenção da concentração do dado ativo próxima à concentração terapêutica), a redução de efeitos colaterais, o aumento da estabilidade [1, 23].

Existem vários tipos de nanocarreadores,como mostrado na Figura 2.8. A depender do ativo que se almeja encapsular e a depender da aplicação, indica-se um nanocarreador específico, que apresente as características morfológicas e físico-químicas particulares para tal objetivo.

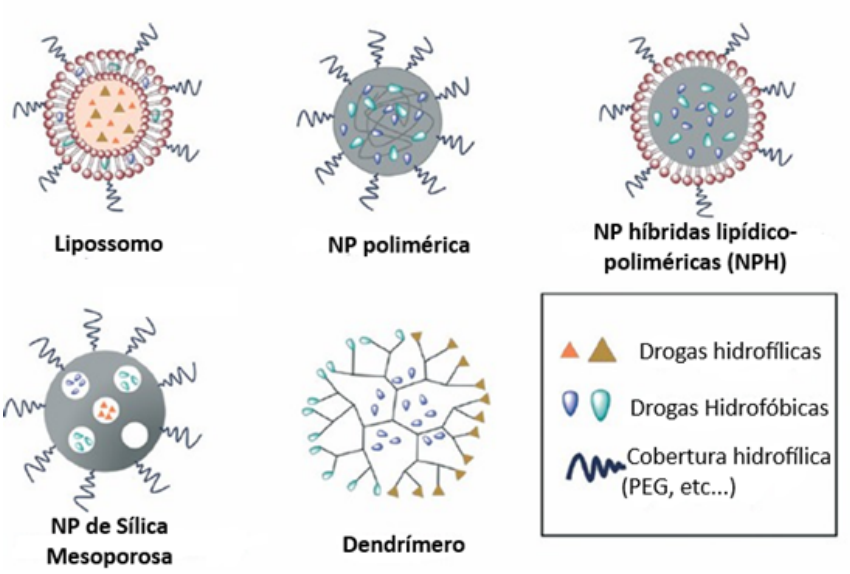


Figura 2.8: Alguns tipos de nanocarreadores [1].

Os lipossomos são vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas, geralmente formadas por fosfolipídios, que se organizam espontaneamente em meio aquoso [25]. Dendrímeros são macromoléculas sintéticas de estrutura tridimensional, simétrica e altamente ramificada, constituídas por um núcleo central, unidades repetidas organizadas em camadas sucessivas (gerações) e grupos funcionais terminais. Sua arquitetura bem definida e controlável proporciona características singulares, como elevada monodispersidade, boa solubilidade e a habilidade de encapsular ou funcionalizar moléculas bioativas tanto em seu interior quanto na superfície [26]. Entretanto, dentre os nanocarreadores apresentados, foram selecionadas como veículo de estudo para o presente trabalho as nanopartículas poliméricas. É importante ressaltar que há muitas vantagens em encapsular ativos em matrizes poliméricas. As nanopartículas poliméricas, em geral, são de fácil produção [27]. Épossível modificar a estrutura, a composição e a morfologia das nanopartículas de maneira a otimizar o processo de transporte de substâncias e promover uma atuação em locais específicos do corpo [24]. Ademais, os polímeros normalmente apresentam elevada resistência quando expostos a diversas condições, como a variações de pH (variações estas observadas no corpo humano) ou mesmo a atuação de enzimas; dessa maneira, assegura-se a proteção do ativo, garantindo que o composto atinja o local indicado de liberação [2, 28]. Outro ponto de destaque é a liberação controlada e prolongada proporcionada, em geral, pelas nanopartículas poliméricas, assegurando um tratamento terapêutico em um intervalo adequado, mitigando potenciais efeitos colaterais [28]. A Figura 2.9 ilustra as duas subclassificações de nanopartículas poliméricas: nanocapsulas e nanoesferas. As nanoesferas englobam nanopartículas poliméricas maciças, contendo o ativo disperso na matriz polimérica; enquanto as

nanocápsulas apresentam uma estrutura oca, um núcleo interno e uma membrana polimérica recobrindo este núcleo (o ativo pode estar disperso no núcleo ou na matriz polimérica).

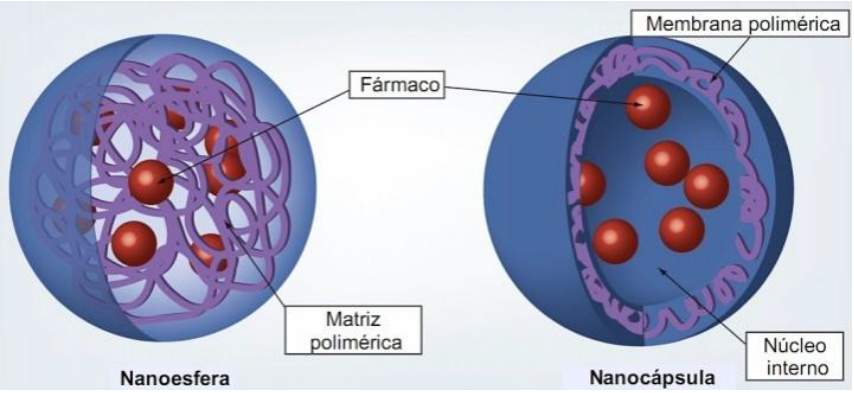


Figura 2.9: Morfologia de nanopartículas encapsuladas com fármaco: nanocápsulas e nanoesferas [2].

De acordo com MIRANDA, o perfil de liberação do ativo é influenciado pelo tipo de polímero que compõe a nanopartícula, pela distribuição de tamanhos de partícula, pela distribuição de massa molar das cadeias de polímero e também pelo grau de hidrofobicidade do material. Vale pontuar que, em função dos polímeros empregados, as nanopartículas podem ser naturais ou sintéticas. As matrizes poliméricas podem ser também biocompatíveis, ou biodegradáveis e biocompatíveis. MIRANDA pontua que polímeros biodegradáveis sintéticos tem um perfil de liberação mais prolongado que polímeros naturais. Os polímeros naturais proporcionam, em geral, uma libertação mais rápida do fármaco das nanopartículas, pois decompõem-se em poucas horas; enquanto os polímeros sintéticos favorecem uma libertação mais prolongada do fármaco, pois resistem à degradação pelo organismo por dias ou até semanas [13, 29].

O polimetacrilato de metila (PMMA) é amplamente utilizado em aplicações médicas e odontológicas por ser biocompatível e por sua baixa toxicidade [30].Além disso, acredita-se que o fármaco será liberado e, após um determinado período que deverá ser avaliado de maneira mais aprofundada, as partículas serão excretadas pelo organismo.

Ao avaliar as metodologias de síntese de nanopartículas poliméricas, pode-se citar dois grandes subgrupos: *botton-up* (envolvem técnicas que utilizam monômeros para produção dos polímeros e formação das partículas nanométricas); e *top-down* (englobam técnicas que partem de polímeros pré- formados e buscam atingir escalas nanométricas) [31]. Tais técnicas serão discutidas mais detalhadamente na próxima seção.

2.3 Métodos de Síntese de Nanopartículas Poliméricas

Há diversos métodos de síntese de nanopartículas poliméricas e cada método resultar em partículas com propriedades específicas, indicadas para aplicações particulares [24]. A seleção do método mais apropriado desempenha um papel crucial na obtenção de nanopartículas com as propriedades desejadas para uma aplicação que se almeja, uma vez que a metodologia de síntese irá afetar diretamente a distribuição de tamanhos de partícula, o grau de polidispersão, a morfologia de tais partículas, a presença de grupamentos funcionais, dentre outras propriedades [32]. Como mencionado anteriormente, os métodos de síntese podem ser classificados em dois grupos distintos: aqueles baseados na polimerização de monômeros e aqueles que fazem uso de polímeros pré-formados. Os métodos de produção de nanopartículas a partir do emprego de polímeros pré-formados incluem métodos de evaporação de solventes, de nanoprecipitação, de uso de tecnologias envolvendo fluido supercrítico, dentre outras metodologias. Por outro lado, os métodos de síntese a partir da polimerização de monômeros abrangem reações de polimerização em suspensão, emulsão, polimerização interfacial, dentre outras [33].

Nesse contexto, as polimerizações em emulsão (incluindo polimerização em emulsão clássica, em miniemulsão e em microemulsão), apresentam inúmeras vantagens. Primeiramente, os métodos em emulsão, em geral, são menos propensos a problemas térmicos e de viscosidade, tornando-os versáteis e eficientes para produção de nanopartículas. Além disso, são processos que também permitem a produção de polímeros de alto peso molecular sem comprometer as taxas de reação, uma vantagem importante para a indústria. Ademais possibilitam a geraçção de partículas em escala nanométrica e o encapsulamento in situ de ativos. Nesse cenário, tais metodologias serão discutidas com maior aprofundamento a seguir.

2.3.1 Polimerização em Emulsão

De acordo com VAUTHIER e BOUCHEMAL, há diferentes métodos de polimerização em emulsão, destacando-se a emulsão clássica, a mini-emulsão e microemulsão [5, 27]. A tabela 2.1 apresenta de forma resumida algumas das características de cada uma das emulsões citadas.

Tabela 2.1: Principais características dos tipos de emulsão[5]

	Emulsão	miniemulsão	microemulsão
Tamanho Médio de partícula	0,01 a 100 μm	<1000 nm	<100 nm
Tensão Interfacial	Baixa	Baixa	Ultra Baixa
Quantidade de surfactante	Alta	Alta	Muito Alta (20% m/m)
Agitação	Agitação mecânica	Agitação mecânica vigorosa	Agitação mecânica

De uma maneira resumida, para realizar uma polimerização em emulsão é necessário unir duas fases imiscíveis e um surfactante [27]. Em geral, faz-se necessário também adicionar um iniciador da reação de polimerização, que, na técnica clássica, é solúvel na fase aquosa [34]. Em relação à temperatura, a faixa normalmente utilizada para o processo de síntese polimérica em emulsão é entre 40^oC e 80^oC [35]. Outros componentes também podem ser adicionados ao meio reacional, como por exemplo o bicarbonato de sódio, que auxilia na manutenção do pH durante a polimerização [34].

Vale ressaltar que cada tipo de emulsão envolve técnicas específicas de agitação, concentrações particulares de surfactante, adição de aditivos específicos, resultando em partículas com características diferenciadas. Ao estudar o encapsulamento de fármacos, as propriedades físico-químicas dos medicamentos, como suas características hidrofílicas ou lipofílicas, também irão afetar o tipo de reação que deverá ser explorada. Fármacos lipofílicos, por exemplo, tendem a ter maior afinidade pela fase orgânica e podem ser encapsulados *in situ* por meio da técnica de emulsão clássica. Em contrapartida, o encapsulamento de fármacos hidrofílicos pela técnica de polimerização em emulsão clássica é bastante restrito, sendo indicadas, por exemplo, as técnicas de polimerização por emulsão inversa ou processos de dupla emulsão [27].

Polimerização em Emulsão Clássica

A polimerização em emulsão clássica envolve inicialmente a adição de um monômero, geralmente pouco solúvel em água, em uma solução aquosa contendo surfactante. A aplicação de forças de cisalhamento dispersa o monômero em pequenas gotículas, tipicamente com cerca de 10 nm de diâmetro. A estabilidade tais gotas é assegurada pela adsorção do surfactante na interface entre o monômero e a fase aquosa. A concentração de surfactante acima da concentração micelar crítica (CMC) resulta na formação de micelas, agregados esféricos compostos por aproximadamente 50-100 moléculas de surfactante [36].O início da reação é marcado pela

adição de iniciadores solúveis, principalmente, em água (por exemplo, persulfato de sódio) ou em óleo (por exemplo, 2,2'-azobisisobutironitrila) [37]. Tais iniciadores são decompostos em radicais livres devido às elevadas temperaturas (75 - 90 °C) ou ação de sistemas redox (quando a reação é realizada a baixas temperaturas), iniciando-se o processo de polimerização. À medida que a reação avança, as micelas absorvem moléculas de monômero contidas nas gotas de monômero, que funcionam como reservatórios [36]. De modo geral, as partículas poliméricas se formam, então, por meio de três processos distintos [38]: entrada de radicais nas micelas (nucleação heterogênea), precipitação de oligômeros na fase aquosa (nucleação homogênea) e entrada de radicais nas pequenas gotículas de monômero. No entanto, é importante notar que as gotículas de monômero são consideravelmente maiores (1–10 µm) do que as micelas inchadas com monômeros (10–20 nm), resultando em uma baixa probabilidade de entrada de radicais nas gotículas de monômero. Assim, a nucleação homogênea e heterogênea são os principais mecanismos de formação de partículas. Durante a reação, as moléculas de monômeros são consumidas, resultando no crescimento das partículas e na diminuição das gotículas de monômero (reservatórios); a quantidade de e micelas também diminui, uma vez que moléculas do surfactante são necessárias para estabilização das novas partículas poliméricas. O fim desse estágio é marcado pelo desaparecimento das micelas e com uma conversão de monômeros entre 5% e 10%, geralmente [39].

Com o fim da nucleação, o sistema passa a ser caracterizado pela presença apenas de gotículas de monômero e partículas de polímero. No entanto, o crescimento das partículas, devido à difusão dos monômeros, resulta no fim das gotículas de monômero no meio. Esta etapa se encerra com conversão em torno de 15% a 40%, marcando o início da última etapa, em que a concentração de monômeros nas partículas diminui continuamente. Ao final da polimerização, todas as moléculas de monômero são consumidas dando origem a uma suspensão coloidal estável de polímeros em água (látex) [40]. Vale ressaltar que a fase aquosa pode conter outros aditivos, como estabilizantes e, reguladores de pH, que afetam o curso da reação de polimerização. Além disso, o controle preciso da temperatura é fundamental, pois exerce um impacto significativo na taxa de reação e no tamanho das partículas poliméricas geradas.

Polimerização em Microemulsão

A polimerização em microemulsão difere da emulsão convencional em relação à adição de altas concentrações de surfactante e/ou a presença de co-surfactantes no sistema. Uma das formulações mais estudadas envolve a combinação de um surfactante aniônico, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), e um co-surfactante, como o 1-pentanol. A adição do 1-pentanol na camada de SDS presente ao redor de uma

gota de óleo resulta em uma notável redução na força de repulsão eletrostática entre as moléculas aniônicas de SDS. Esse processo minimiza a tensão na interface óleo-água, aumentando a flexibilidade da membrana na referida interface. Esses fatores sinérgicos convergem para a formação de uma microemulsão termodinamicamente estável [41].

Embora as polimerizações em emulsão e microemulsão possam parecer similares, elas apresentam diferenças quanto ao mecanismo. Tanto as microemulsões óleo-em-água (O/A) quanto as água-em-óleo (A/O, também chamada de microemulsões inversas) consistem em inúmeras gotículas pequenas de óleo (ou água) com diâmetros na faixa de 1 a 10 nanômetros, dispersas em uma fase aquosa (ou oleosa) contínua. Assim, a microemulsão engloba principalmente microgotículas de monômeros, com um diâmetro médio de 4 nm, que desempenham um papel fundamental na nucleação e crescimento das partículas de látex [42]. O resultado final consiste em partículas de polímero mantidas em suspensão por meio dos surfactantes e/ou co-surfactantes, juntamente com micelas vazias, devido à quantidade excessiva do emulsificante [43].

Dessa forma, a polimerização em microemulsão representa um método simples para a produção de partículas de látex extremamente pequenas, variando entre 10 e 50 nanômetros. Tais partículas são compostas por polímeros de peso molecular consideravelmente elevado, na ordem de aproximadamente 15.10^6 Da, sendo desafiador o preparo de materiais com tais características por meio dos métodos clássicos de polimerização.

Polimerização em Miniemulsão

A polimerização em miniemulsão também apresenta discrepâncias em relação à técnica clássica de emulsão, sendo um método altamente eficaz para produzir materiais complexos. Os materiais gerados por meio dessa técnica têm sido aplicados em diferentes áreas, como adesivos, revestimentos para resistir a reflexos, corrosão e raios UV, e também para encapsulamento de fármacos [44].

Por meio desta técnica de polimerização, gotículas de monômeros de tamanho submicrométricas são obtidas a partir de um intenso processo de agitação na presença de concentrações baixas de surfactantes e de co-estabilizantes (como hexadecano e alcool cetílico). Os compostos co-estabilizantes, que podem ser adicionados ao meio reacional, atuam de maneira a dificultar a difusão de moléculas de monômero das gotas menores para as maiores, em função du aumento da estabilidade osmótica. Consequentemente, as gotículas de monômeros passam a apresentar área superficial suficientemente elevadas para com- petir efetivamente com as micelas e se tornarem também pontos relevantes de nucleação e formação de partículas poliméricas [41]. Um destaque desse processo reside, então, na nucleação de gotículas, possibilitando a utilização eficiente de monômeros hidrofóbicos, uma vez que transferência de massa

entre gotas de monômero é minimizada [38, 45].

Dessa forma, a polimerização em miniemulsão emerge como uma estratégia altamente promissora na produção de materiais poliméricos com baixo diâmetro médio de partícula, sem haver a necessidade de adicionar solventes, apresentando um controle térmico simplificado e permitindo a obtenção de polímeros com taxas de polimerização e pesos moleculares elevados [38, 45].

2.4 Síntese de Nanopartículas Poliméricas de PMMA Contendo Ativos Encapsulados

Os polímeros empregados na área farmacêutica podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Os polímeros biodegradáveis são naturalmente metabolizados pelo organismo, devendo seus produtos de degradação necessariamente atóxicos para o corpo; já os polímeros não-biodegradáveis precisam ser retirados do corpo após a liberação do ativo, exceto para aplicações específicas, como uso em processos de embolização vascular ou para síntese de cimento ósseo. Caso contrário, a eliminação total desses materiais poliméricos é essencial para evitar o acúmulo desses compostos no organismo [46].

Nesse contexto, como mencionado anteriormente, o PMMA é um polímero não-biodegradável, mas que apresenta elevada biocompatibilidade, sendo largamente empregado na área médica e farmacêutica. O processo de polimerização do MMA por miniemulsão possibilita a formação de nanopartículas poliméricas e o encapsulamento *in situ* de ativos de forma escalável. Durante a reação de síntese, cada nanogotícula funciona como um nano-reator, permitindo maior troca térmica e alcance de elevadas massas molares, além de tamanho de partículas em escala nanométrica [14].

Na Tabela 2.2 são apresentados alguns trabalhos da literatura que estudaram o encapsulamento *in situ* de diferentes fármacos em nanopartículas de PMMA. É importante ressaltar que todos os trabalhos foram baseados na técnica de polimerização em miniemulsão. É possível observar que a eficiência de encapsulamento encontrada nos diferentes estudos foi elevada, acima de 95%, e o diâmetro médio de partículas foi mantido abaixo de 100 nm. O tamanho ideal para administração de nanopartículas para os pulmões variam de 50 nm a 300 nm [47, 48]. Os meios mais comuns de administração de nanocarreadores são inalação, instilação intratraqueal, pulverização intratraqueal e instilação intranasal [49].

Tabela 2.2: Trabalhos de Encapsulamento de Fármacos Desenvolvidos pelo Grupo empregando PMMA como matriz polimérica.

Referência	Fármaco	Tamanho	Eficiência de Encaspulamento
MENDES et al. (2012)	-	90 nm	-
MENDES et al. (2017)	Piper Cabralanum	200 nm	100 %
RAMOS, I.M.F.C. (2018)	Clioquinol	60-100 nm	>97 %
ALVES et al.(2021)	Praziquantel	68nm 93 nm	>98 %
MANGIA et al. (2021)	Rivastigmina	< 100 nm	80 %

2.5 Azitromicina

A azitromicina é uma substância antibiótica da classe dos macrolídeos, os quais possuem um anel macrocíclico de lactôna, derivada da eritromicina [50]. A estrutura molecular difere da eritromicina pela inclusão de um átomo de nitrogênio no anel lactônico formado, portanto, por 15 átomos [51]. A Figura 2.10 ilustra a estrutura molecular da azitromicina. Este fármaco tem aspecto de um pó branco e é encontradao na forma anidra, mono ou dihidradata. A solubilidade de tal antibiótico em água é muito baixa, sendo praticamente insolúvel em meio aquoso, e possui um coeficiente de partição octanol/água de 4,02 [50, 52]. Os nitrogênios presentes no anel lactânico e no aminoaçúcar tem pKas 8,1 e 8,8 [53]. A solubilidade da azitromicina em água é muito baixa, enquanto que em etanol é solúvel.

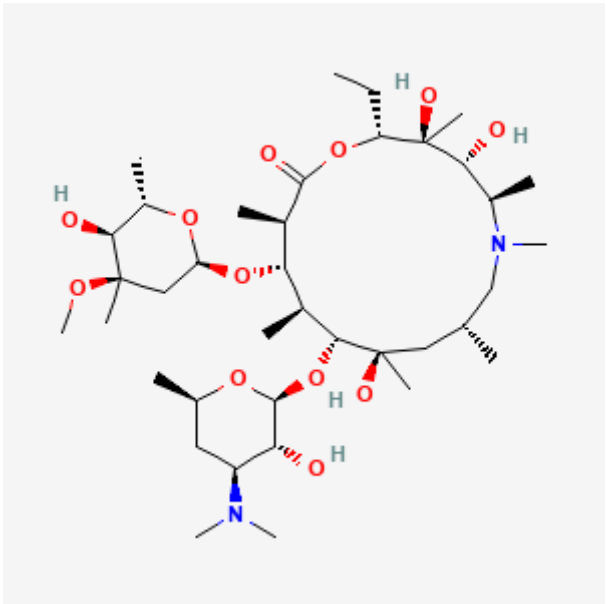


Figura 2.10: Estrutura molecular da Azitromicina [3].

Conhecida por ser um antibiótico de amplo espectro, a azitromicina age contra microorganismos patogênicos gram-positivos e gram-negativos, apesar de apresentar

maior eficácia para este último [19]. O mecanismo de ação consiste em impedir a síntese de proteínas bacterianas por meio da ligação ao RNA ribossomal [54]. Dessa forma, a administração de azitromicina é indicada para o combate a uma série de infecções do trato respiratório superior e inferior, como amidalite e pneumonia; no combate a outras doenças infecciosas como conjuntivite granulomatosa, otite, clamídia, fibrose cística; e, até mesmo, para a prevenção de infecções em crianças e pessoas com o sistema imunológico debilitado [19, 50, 51, 55]. Outro destaque é que a azitromicina, aparentemente, não apresenta toxidade a mulheres grávidas, sendo indicada para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis durante a gestação [51]. Contudo, a azitromicina pode causar alguns efeitos adversos, que variam entre leves e moderados, e, em sua maioria, estão relacionados ao trato gastrointestinal, como, por exemplo, náuseas, vômitos e diarréia [55].

Em relação a administração do medicamento, a azitromicina é normalmente utilizada em uma dose única diária, por via oral, em que a dosagem recomendada para crianças com menos de 45kg é de 10 mg/kg e para adultos é de 500 mg/kg, não ultrapassando o total de 1,5g [55]. A possibilidade de administração em dose única diária está associada ao tempo de meia vida de tal medicamento no corpo, que perdura entre 32 e 68 horas [50, 51]. Entretanto, há doenças e circunstâncias que alteram a quantidade terapêutica, como em indivíduos portadores de HIV, que, por exemplo, utilizam 600 mg de azitromicina combinadas com um ou mais agentes para o tratamento de doenças causadas por *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* [51, 55]. Em doses orais de 500 mg, o pico de concentração no plasma sanguíneo ocorre entre 2 e 3 horas após a ingestão, que é por volta de 0,4 mg/ml, o que representa uma biodisponibili- dade em torno de 37% em adultos saudáveis [19, 50, 51, 56]. Após a administração intravenosa de 500 mg de azitromicina, o pico de concentração acontece em torno de uma hora e se estabelece entre 3 e 4 mg/ml [51]. Em função da administração oral resultar em uma concentração bem baixa do fármaco no sangue e a intravenosa (que resulta em uma concentração no sangue até 10x maior que a concentração obtida por via oral) ser uma forma mais severa, invasiva e mais complexa de autotratamento, há necessidade de desenvolver métodos alternativos de tratamento.

Destaca-se, assim, o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para o encapsulamento da azitromicina. Além dos inúmeros benefícios associados ao processo de encapsulamento, já mencionados, busca-se alcançar concentrações mais altas do fármaco no organismo por períodos mais longos, ao comparar com o ativo livre. Por esse motivo, por meio da análise bibliométrica, percebeu-se que muitos estudos foram conduzidos com o objetivo de proteger o ativo e aumentar a estabilidade da azitromicina no organismo.

TOTI *et al.* (2011) foram os pioneiros no estudo de encapsulamento da azitro-

micina. Contudo, os autores exploraram o uso de nanopartículas poliméricas de poli(ácido lático-co- ácido glicólico) (PLGA). ZHANG *et al.* (2014) estudaram o encapsulamento da azitromicina em micropartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxioctanoato) (P(HB-HO)). Contudo, nota-se que o foco do trabalho era a síntese de partículas em escala micrométrica; escala esta inviável para as aplicações que se almeja no presente trabalho. Buscou-se neste trabalho produzir nanopartículas com tamanho médio de 100 nm. Alguns trabalhos também têm explorado o uso de matrizes naturais, como polímeros à base de quitosana [59, 60] . No entanto, nenhum estudo foi encontrado envolvendo o uso do PMMA para o encapsulamento da azitromicina por polimerização em miniemulsão, ressaltando o caráter inovador do presente trabalho.

2.6 Naproxeno

O naproxeno é um medicamento anti-inflamatório não esteróide (NSAID) com ação analgésica, que foi inserido no mercado farmacêutico em 1976 [61]. Esse medicamento é indicado normalmente para o combate a inflamações reumatológicas e, ocasionalmente, em condições não reumáticas [20]. Além da atividade anti- inflamatória, o naproxeno também apresenta efeitos que aliviam alguns sintomas de doenças virais, como tosse, dor de cabeça, fadiga, insuficiência respiratória [62]. A estrutura do fármaco pode ser observada na figura 2.11 a seguir.

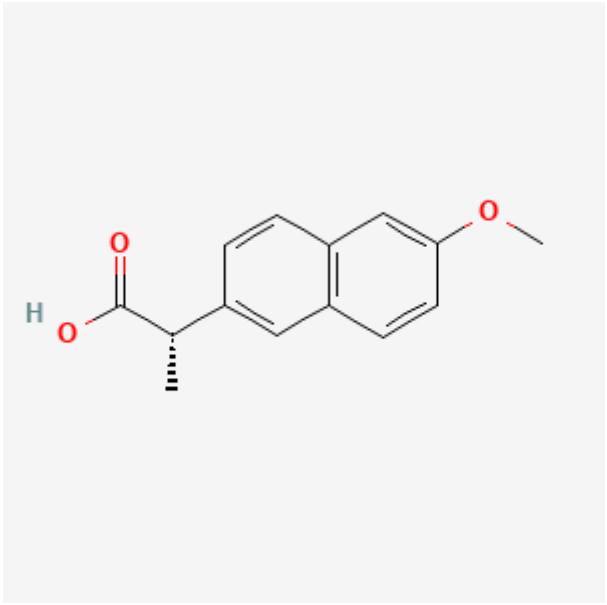


Figura 2.11: Estrutura molecular do Naproxeno [4].

Apesar de a estrutura apontar o grupamento ácido, o naproxeno pode ser encontrado também na forma de sal de sódio [20]. TODD e CLISSOLD (1990) relataram

que a principal diferença entre o ácido e o sal é que o sal é absorvido mais rapidamente e, por isso, a concentração atinge níveis mais altos no sangue em menos tempo. O naproxeno pode ser administrado por via oral ou retal, sendo completamente absorvido em ambas as formas de terapia.

Apesar da eficácia no tratamento de doenças, o naproxeno pode estar associado a alguns efeitos colaterais de acordo com a literatura. Os medicamentos antiinflamatórios não esteróides, como o naproxeno, são muitas vezes associados a problemas no trato gastrointestinal [63]. De acordo com HENRY (1988), o problema mais comum causado por NSAID é a dispepsia. Os efeitos colaterais mais severos, que ocorrem de maneira mais rara, envolvem úlcera hemorrágica, síndrome de Stevens-Johnson e agranulocitose [63].

Há estudos que também relacionam o uso de NSAIDs, que é o grupo ao qual o Naproxeno pertence, a insuficiência funcional renal e a danos renais agudos [63]. De acordo com WHELTON e WATSON (1998), de 1 a 3% das pessoas que utilizam os NSAIDs desenvolvem algum tipo de problema renal. Outro ponto de atenção é que tanto os NSAIDs, quanto os problemas causados aos rins são fatores de risco que podem causar insuficiência cardíaca [65]. Dessa forma, é evidente a necessidade por desenvolver medicamentos orais mais eficientes e o encapsulamento, por tudo que foi discutido, é uma alternativa bastante promissora.

O primeiro trabalho descrito na literatura focado no encapsulamento do fármaco naproxeno foi publicado em 1996, ressaltando que este tema também é relativamente recente. KIM *et al.* (1996) estudaram o encapsulamento do naproxeno empregando poli(ácido lático) (PLA) visando à produção de micropartículas. WANG *et al.* sintetizaram nanopartículas à base de polímeros de (PLA) e polietilenoglicol (PEG). Estudos também vem sendo conduzidos explorando matrizes naturais à base de quitosa e alginato, por exemplo [68, 69]. Novamente, até o momento, não foi encontrado nenhum estudo focado no emprego do PMMA para o encapsulamento do naproxeno.

2.7 Considerações Finais

Por tudo o que foi apresentado, é possível perceber que poucos trabalhos visam à síntese de nanopartículas de poli(metacrilato de metila) para encapsulamento in situ de fármacos. Ao focar nos fármacos azitromicina e naproxeno, que apresentam ação contra COVID-19 ou doenças secundárias ocasionadas pela doença, percebe-se que pouquíssimos trabalhos exploram o encapsulamento de tais medicamentos. Além disso, não foi encontrado nenhum estudo na literatura técnico-científica que empregasse o polímero biocompatível PMMA no encapsulamento *in situ* de tais fármacos. Dessa forma, buscou-se com o presente trabalho produzir nanopartículas poliméricas contendo fármacos encapsulados (fármacos com ação contra os sintomas

de COVID-19 e contra infecções oportunistas). Como mencionado, o foco principal do trabalho foi o encapsulamento dos fármacos azitromicina (empregado no combate às infecções oportunistas) e naproxeno (utilizados combate aos sintomas de COVID-19) em nanopartículas poliméricas à base de poli(metacrilato de metila) (PMMA) explorando a técnica de polimerização em miniemulsão. Assim, destaca-se a relevância tecnológica, científica e de saúde pública do tema e o grande potencial de aplicação dos nanosistemas produzidos.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais empregados nas reações de polimerização e análises de caracterização

Para o preparo das reações de polimerização em miniemulsão, o surfactante utilizado foi o lauril sulfato de sódio (LSS), fornecido pela Vetec Química Fina Ltda., com pureza mínima de 90% e 10% de umidade. Também utilizou-se bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), que foi fornecido pela Proquimios Ltda., com pureza mínima de 99,7%, para a estabilização do pH durante o processo de polimerização. O iniciador empregado foi o persulfato de potássio P.A. ($K_2S_2O_8$), fornecido pela Vetec Química Fina Ltda., com pureza mínima de 99%. Para o preparo da solução com iniciador e da fase aquosa, foi utilizada água destilada.A fase orgânica foi preparada empregando-se monômero metacrilato de metila (MMA), com pureza mínima de 99,5%, fonecido pela Sigma-Aldrich Brasil Ltda..

Para a avaliação da cinética da reação de polimerização, foi utilizada hidroquinona fornecida pela Vetec Química Fina Ltda., com pureza mínima de 99%, que inibe a reação de polimerização. O tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, com pureza mínima de 99%, fornecido pela Sigma-Aldrich Brasil Ltda., foi utilizado para a fase móvel e para solubilizar as amostras poliméricas para a análise de cromatografia de permeação em gel.

3.2 Síntese de nanopartículas de PMMA contendo fármacos encapsulados

Primeiramente, foi realizado o preparo de cada uma das soluções que compõem da miniemulsão. A fase aquosa foi composta pelas soluções aquosas de bicarbonato de sódio e de lauril sulfato de sódio. Separadamente, preparou-se a solução aquosa

do iniciador perssulfato de potássio. A fase orgânica foi formada pelo monômero metacrilato de metila e pelos fármacos de interesse. Todas as soluções foram agitadas até que todos os reagentes estivessem completamente solubilizados, incluindo os medicamentos. A Tabela 3.1 apresenta as quantidades dos reagentes empregados nas reações realizadas almejando-se o encapsulamento de azitromicina.

Tabela 3.1: Massa dos Componentes de cada Reação

	Reagentes	% m/m (MMA)	Massa Teórica (g)
Fase Aquosa	Bicarbonato de Sódio	0,38%	0,064
	Lauril Sulfato de Sódio	0,50%	0,080
	Água		61,950
	Água*		5,250
	Perssulfato de Potássio*	0,50%	0,084
Fase Orgânica	Azitromicina	5%	0,800
	Metacrilato de Metila		16,000

* pesados separadamente

Na Tabela 3.2 são apresentadas as quantidades dos reagentes utilizados nas reações conduzidas buscando-se o encapsulamento do naproxeno.

Tabela 3.2: Massa dos Componentes de cada Reação

	Reagentes	% m/m (MMA)	Massa Teórica (g)
Fase Aquosa	Bicarbonato de Sódio	0,38%	0,064
	Lauril Sulfato de Sódio	0,50%	0,080
	Água		61,950
	Água*		5,250
	Perssulfato de Potássio*	0,50%	0,084
Fase Orgânica	Naproxeno	2%	0,320
	Metacrilato de Metila		16,000

* pesados separadamente

Na etapa seguinte, verteu-se a fase aquosa (composta pelas soluções de bicarbonato de sódio e lauril sulfato de sódio) na fase orgânica, a qual foi mantida em agitação durante 5 minutos num agitador de placas. Decorrido o tempo, a emulsão foi conduzida ao sonicador, na intensidade de 40% durante 5 minutos, para a formação da miniemulsão. Em seguida, a miniemulsão foi vertida em um reator de vidro de 100 ml, mantendo-se a velocidade de agitação em 500 rpm e temperatura em 80 °C.

Quando o meio reacional atingiu a temperatura de interesse, adicionou-se a solução de perssulfato de potássio, marcando-se o início da reação. Todos as reações foram conduzidas por duas horas.

É importante notar que os teores encapsulados de cada um dos fármacos não foram os mesmos, pois ambos apresentam solubilidades distintas no monômero MMA. E, para garantir uma distribuição uniforme do fármaco na nanoesfera produzida, indica-se conduzir os experimentos dentro da faixa de solubilidade do fármaco no monômero [70] . Nesse contexto um estudo prelimicar foi conduzido, identificando-se, inicialmente, um limite de solubilidade da azitromicina em MMA levemente superior a 7.5% (m/m) e um limite de aproximadamente 3% (m/m) para o naproxeno no monômero estudado.

3.3 Avaliação do Efeito da Concentração de Surfactante e de Fármaco

A fim de compreender compreender de forma quantitativa e independente se as variáveis, concentrações de surfactante e de fármaco, poderiam interferir na conversão do MMA e no diâmetro médio das partículas produzidas foi efetuado um planejamento experimental.

O planejamento experimental foi criado baseado no plano fatorial em dois níveis, com tréplicas apenas no ponto central. Denifiu-se dessa forma porque nenhum outro estudo avaliou o encapsulamento de azitromicina e naproxeno em partículas de PMMA [71]. As Tabelas 3.3 e 3.4 mostram o planejamento experimental da azitromicina e do naproxeno.

Tabela 3.3: Plano experimental completo associado ao encapsulamento da azitromicina

Experimento	Surfactante (% m/m)	Surfactante Adimencional(z_2)	Azitromicina (% m/m)	Azitromicina Adimensional(z_1)
1	0,5	0	5	0
2	0,5	0	5	0
3	0,5	0	5	0
4	0,75	+1	2,5	-1
5	0,75	+1	7,5	+1
6	0,25	-1	7,5	+1
7	0,25	-1	2,5	-1

Tabela 3.4: Plano experimental completo completo associado ao encapsulamento do naproxeno.

Experimento	Surfactante (% m/m)	Surfactante Adimencional(z_2)	Naproxeno (% m/m)	Naproxeno Adimensional(z_1)
1	0,5	0	2	0
2	0,5	0	2	0
3	0,5	0	2	0
4	0,75	+1	1	-1
5	0,75	+1	3	+1
6	0,25	-1	3	+1
7	0,25	-1	1	-1

Dessa forma, conforme mostrado nas tabelas 3.3 e 3.4, as variáveis escolhidas foram a massa de surfactante e a massas dos fármacos. A região de experimentação considerada foi de 50% de variação dos valores originais de surfactante e de fármaco, 0,5% (surfactante), 5% (azitromicina) e 3% (naproxeno) . A equação utilizada para tornar as quantidades de surfactante e de fármaco adimencionais é mostrada a seguir [71].

$$z_i = \frac{x_i - \left(\frac{x_i^{max} + x_i^{min}}{2}\right)}{\frac{x_i^{max} - x_i^{min}}{2}} \tag{3.1}$$

Nessa equação, *max* e *min* representam os limites superiores e inferiores da região de experimentação. É importante destacar que ao realizar as réplicas somente no ponto central, considerou-se a hipótese de que as flutuações são constantes ao longo da região de experimentação.

3.4 Análise Estatística

A determinação dos erros experimentais envolvidos no processo de polimerização e de caracteriação é de fundamental importância no estudo experimental,uma vez que se pode atingir conclusões completamente equivocadas, caso os erros experimentais não sejam avaliados [71]. Dessa forma, para realizar o cálculo dos erros experimentais, considerou-se que os erros calculados a partir das réplicas no ponto central seriam mantidos para as demais condições experimentais. Todos esses valores foram calculados a partir do *software* Statistica 12, sendo considerado grau de confiança de 95

O objetivo do planejamento experimental foi analisar quantitativamente a influência das concentrações de surfactante e de cada um dos fármacos (variáveis de entrada) na conversão do MMA e no tamanho médio de partícula (variáveis resposta) e elaborar modelos empíricos capazes de descrever as variáveis resposta em função das variáveis de entrada. As atividades de desenvolvimento de modelos empíricos também foram realizadas com auxílio do *Software* Statistica versão 7.0 desenvolvido pela StatSoft Inc.

3.5 Conversão

A conversão do monômero MMA ao longo do tempo em cada um dos experimentos foi calculada a partir do método gravimétrico, como mostrado na equação 3.2

$$C(t) = \frac{\text{massa do polímero(t)}}{\text{massa da amostra(t)} \cdot \text{fração orgânica}} \cdot 100 \tag{3.2}$$

Para realizar o cálculo de conversão, retiraram-se alíquotas do reator após 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos do início da reação. Tais alíquotas foram pesadas e secas. Considerou-se, então, a massa da amostra pesada imediatamente após a retirada do reator e a massa de polímero pesada após o processo completo de secagem. O processo de secagem foi realizado em placa de aquecimento, até o momento em que a massa não apresentava variação significativa no valor. A fração orgânica representa o percentual mássico da fase oleosa presente na emulsão.

3.6 Distribuição de Tamanhos de Partícula

Para a realização das análises para avaliação da distribuição de tamanhos de partícula, utilizou-se um espectrofotômetro modelo Zetasizer Nano-ZS, fornecido pela Malvern Instruments, que avalia os tamanhos de partícula na faixa de 0,3 nm a 10 µm. Esse equipamento analisa o espalhamento de luz provocado pelo movimento Browniano das partículas suspensas na fase líquida e, por meio de modelos matemáticos, calcula-se o tamanho médio de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula.

Durante o processo reacional, alíquotas foram retiradas do reator e conduzidas para análise. Tais amostras foram colocadas em cubetas de vidro de 4 mL. Em seguida, cada amostra foi analisada em triplicata e as curvas de distribuição de tamanho para cada tempo reacional foram obtidas.

3.7 Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Uma das técnicas que foi utilizada para a avaliação da composição das partículas poliméricas foi o FTIR. Essa técnica é bem estabelecida para materiais poliméricos, que possibilita análises da composição química das matrizes [72]. As análises foram realizadas no espectrômetro de FTIR modelo Nicolet 6700, da Thermo Scientific, em condição ambiente. A faixa de número de onda foi de 500 a 4000 cm^{-1}, com 128 varreduras de resulução de 4 nm em modo de transmitância.

3.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica valiosa no estudo da estrutura molecular e composição química de substâncias. Ela se fundamenta na interação entre núcleos atômicos com spin não nulo de uma amostra e um campo magnético externo. Quando expostos a este campo, os núcleos atômicos reagem, absorvendo energia, fenômeno conhecido como ressonância. Após a absorção, esses núcleos dissipam a energia, retornando aos estados fundamentais e transferindo essa energia para o ambiente circundante, podendo ser detectada por um espectrômetro. A frequência de ressonância varia conforme o tipo de núcleo, o campo magnético aplicado e o ambiente químico, resultando em sinais característicos registrados nos espectros de RMN [73].

Os espectros de RMN representam graficamente a intensidade do sinal em relação ao deslocamento químico, i.e., a frequência de ressonância de um núcleo atômico em relação a um padrão. Esses deslocamentos químicos, determinados por RMN, são influenciados por diversos fatores, incluindo o ambiente eletrônico dos núcleos, grupos funcionais, efeitos de blindagem, temperatura e solvente. Em função desses fatores e, por apresentar alta precisão, a RMN é muito utilizada para monitorar reações de polimerização [74]. Dentre as diferentes modalidades dessa técnica, a 1H RMN se destaca por sua alta sensibilidade devido à elevada razão giromagnética e à abundância natural do deutério [75], o que permite a caracterização da composição, sequência monomérica e taticidade, além de possibilitar a identificação de grupos terminais e interações moleculares nos polímeros [76].

Dessa forma, neste estudo, empregou-se a técnica de 1H RMN para avaliação da dos composição das nanopartículas poliméricas. Os experimentos foram conduzidos utilizando um espectrômetro Bruker (modelo AVIII-500, fornecido pela Brooker, Billerica, EUA), operando a uma 500,1 MHz e com sonda de 5 mm. Cada amostra foi preparada por dissolução em 1 mL de clorofórmio deuterado.

3.9 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) é um dos métodos mais utilizados para determinação do tamanho das cadeias poliméricas e do grau de a polidispersidade de cadeias [77]. O procedimento envolve o uso de uma coluna preenchida com uma material poroso. Assim, após a solubilização do material polimérico, uma amostra é injetada em tal coluna. As cadeias de maior volume hidrodinâmico são, então, impedidas de ingressar nos poros da coluna e são rapidamente eluídas; as cadeias de menor volume hidrodinâmico acabam por penetrar nos poros da coluna, permanecendo, desse modo, por um período mais prolongado na coluna até serem eluídas [78].

As partículas poliméricas produzidas neste trabalho, foram submetidas à caracterização por GPC para definição da distribuição das massas molares e das massas molares médias das cadeias poliméricas. Para isso, utilizou-se o cromatógrafo modelo GPC Max VE2001, fabricado pela Viscotek, equipado com uma coluna linear KF-804L e uma coluna linear KF-805L. Essas colunas apresentavam tamanhos máximos de poro de $1,5.10^3$ Å e 5.10^3 Å, respectivamente, fornecidas pela Shodex. Um detector refratométrico Viscotek, modelo VE3580, foi empregado no sistema. O solvente utilizado foi o tetraidrofurano (THF), e todas as análises foram conduzidas a uma temperatura de 40 °C.

Para o preparo das amostras foi pesada uma quantidade de 0,015 g de cada amostra e adicionaram-se 3 mL de THF para a solubilização dessas partículas. Após a solubilização, as soluções poliméricas foram filtradas utilizando membranas com um diâmetro de poro de 0,45 µm. Em seguida, os filtrados resultantes (aproximadamente 300 µL) foram injetados no cromatógrafo.

3.10 Análise Termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria consiste na análise da degradação dos compostos em função da temperatura. Nesse sentido, utilizou-se o Analisador Termogravimétrico (TGA) modelo STA-6000, da fabricante Perkin Elmer, para avaliar o perfil de degradação térmica das nanopartículas contendo os fármacos encapsulado e inferir possíveis efeitos de tais medicamentos na estrutura das cadeias poliméricas. Os testes foram realizados na faixa de 25 a 800 ºC, a 10 °C/min, em atmosfera ambiente.

3.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a visualização das nanopartículas sintetizadas, as amostras foram submetidas a análise de MEV. Para isso, as amostras poliméericas precisaram ser recobertas

com ouro, ou seja, passaram pelo processo de metalização em um metalizador Denton Vacuum, modelo Desk V. Após esse processo, as amostras metalizadas seguiram para o microscópio eletrônico modelo Tescan VEGA3, onde as análises foram conduzidas em alto vácuo, com detecção de elétrons secundários. As imagens foram processadas no próprio equipamento. Todas as análises foram conduzidas sob tensão de 10kV. Foram obtidas imagens de aproximação de 20.000 x e 50.000 x.

3.12 Teste de Liberação

Os testes de liberação foram realizados no dissolutor automático *Standard* Ethik.As naopartículas contendo azitromicina foram colocadas em solução de tampão de pH 6 e as nanopartículas contendo naproxeno foram colocadas em solução de tampão de pH 7,5. O processo da análise foi conduzido durante 5 horas para a azitromicina e 6 horas para o naproxeno, ambas à temperatura de 37 oC e sob agitação de 50 rpm. Alíquotas foram retiradas a cada hora, até o final do experimento, com objetivo de construir um perfil de liberação.

As alíquotas coletadas foram encaminhadas a um espectrofotômetro de ultravioleta-visível para microplacas, ThermoScientific. Foram colocados 30 µL de amostra nos poços da placa de quartzo, sendo as análises conduzidas em triplicata. Foi realizada uma varredura do espectro de 200 a 300 nm. As curvas de calibração e detalhes da metodologia adotata são apresentados no Apêndice A.

Capítulo 4

Resultados

Neste capítulo serão mostrados os resultados obtidos a partir das análises descritas no capítulo anterior. Além disso, serão discutidas as influências dos fármacos modelo e do surfactante no processo de polimerização e nas propriedades químicas e texturais das nanopartículas sintetizadas.

4.1 Encapsulamento da Azitromicina

4.1.1 Influência na Conversão

O plano experimental proposto para avaliar o efeito da azitromicina nas reações de polimerização do MMA foi conduzido de maneira satisfatória e todas as reações foram realizadas com sucesso. Para calcular o erro experimental em cada tempo de reação, foram realizadas triplicatas no ponto central. Na Figura 4.1 são apresentadas as conversões dos três experimentos conduzidos na condição do ponto central.

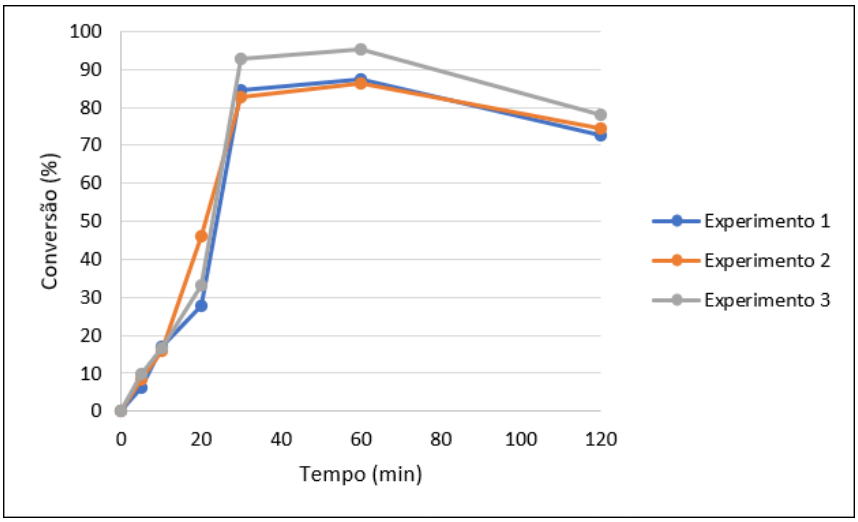


Figura 4.1: Cinética de polimerização do MMA na presença da azitromicina no ponto central.

É possivel notar pela Figura 4.1 que os perfis das curvas de conversão ao longo do tempo são bastante semelhantes. A queda de conversão observada no tempo final de reação, aos 120 minutos, indica uma dificuldade operacional para retirada da última alíquota, possivelmente em função de uma heterogeinadade da distribuição de partículas ao longo do reator no final do experimento. As tabelas contendo os valores das conversões dos experimentos do ponto central e dos demais experimentos do plano experimental são apresentadas no Apêndice A.

A Figura 4.2 mostra as conversões do MMA no experimento de síntese de nanopartículas na ausência do fármaco e nos experimentos do plano experimental da azitromicina. São apresentadas também as médias das conversões de MMA nos experimentos do ponto central. Vale ressaltar que os erros experimentais calculados a partir dos experimentos do ponto central foram considerados os mesmos para cada tempo de cada um dos experimentos do plano da azitromicina.

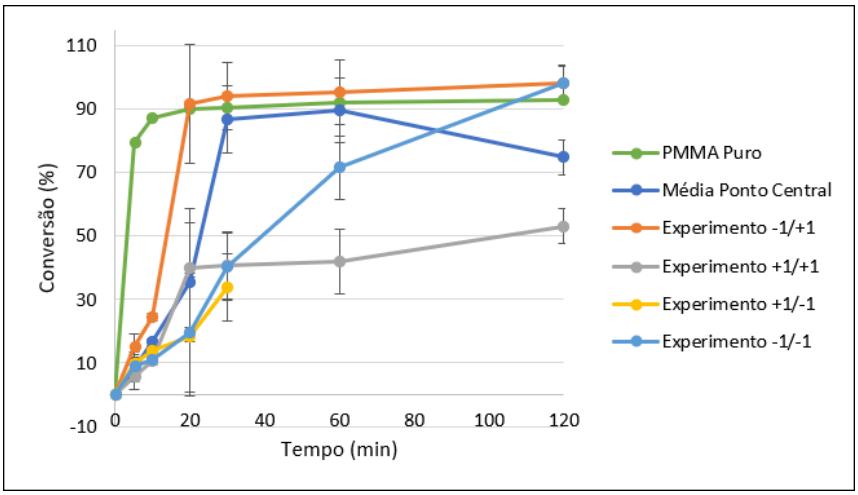


Figura 4.2: Conversão do MMA ao longo do tempo, no plano experimental à base de azitromicina.

Ao analisar a Figura 4.2, percebe-se que cinética de polimerização do MMA puro, na ausência de fármaco, foi a que apresentou a maior velocidade de reação, sendo alcançada uma conversão de aproximadamente 90% em 20 minutos de reação. Nota-se que a adição da azitromicina provocou uma queda na velocidade de reação e também na conversão de MMA, observada ao final da reação. Por exemplo, o experimento (+1/-1), no qual foi adicionada maior quantidade de azitromicina e menor quantidade de surfactante, apresentou a menor velocidade de reação e menor conversão final. É necessário, em trabalhos futuros, que o pH do meio reacional seja avaliado, porque sabe-se que o pKa da azitromicina gira em torno de 8,5. Se o pH está abaixo do valor de pKa, a azitromicina se encontra na sua forma ionizada, o que pode ter contribuido para a interação na reação de polimerização. Nesse sentido, é sugerido que sejam realizados novos ensaios de polimerização com controle de pH em

valores básicos, em torno de 9,5, para que a molécula esteja quase que completamente não-ionizada. Vale pontuar que este experimento não pôde ser conduzido até o tempo de 120 minutos, em função de uma desestabilização da reação, formando-se um grande aglomerado de partículas. A baixa conversão final e baixa velocidade de reação também foi observada para o experimento (+1/+1), em que a maior adicção de surfactante garantiu a estabilidade do látex e assegurou a condução da reação de polimerização por 120 min. Em contrapartida, o aumento na concentração de surfactante provocou um aumento na velocidade de polimerização do MMA, como esperado, uma vez que garantiu maior estabilidade das gotas de monômero no meio reacional e, consequentemente, possibilitou um aumento da nucleação de tais estruturas pelos radicais livres formados no meio. A condição explorada no experimento (-1/+1) destaca-se no plano proposto, uma vez que conversões elevadas foram obtidas a velocidades de reação também expressivas.

4.1.2 Influência na Morfologia

Micrografias

Para avaliar a morfologia das nanopartículas produzidas, foram realizadas diversas análises de MEV. A Figura 4.3 apresenta as micrografias obtidas para os experimentos conduzidos nas condições do ponto central.

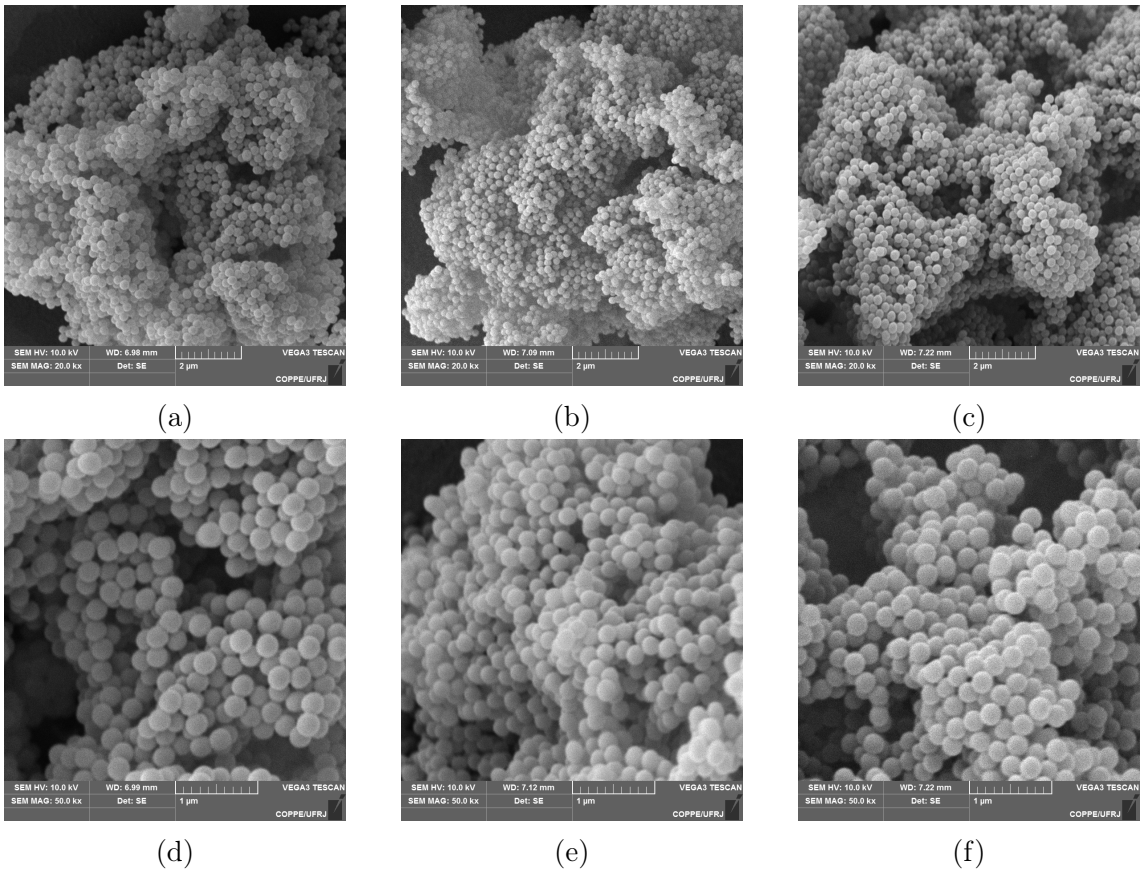
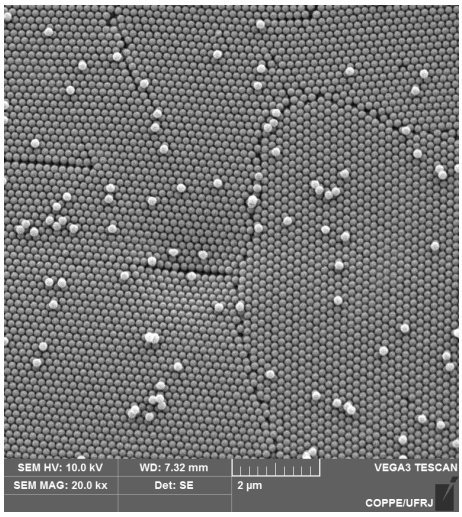


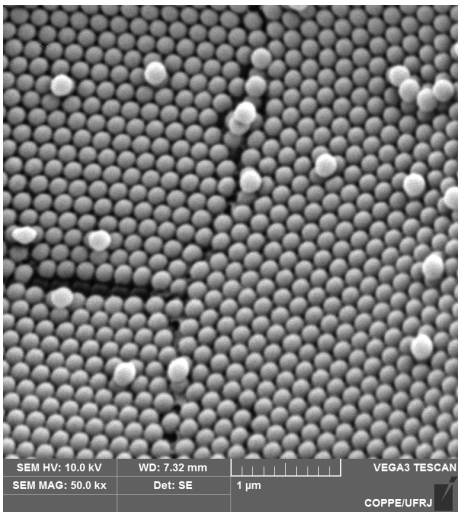
Figura 4.3: Micrografias das partículas produzidas nos experimentos do ponto central: (a) experimento 1, 20.000x; (b) expermento 2, 20.000x; (c) experimento 3, 20.000x; (d) experimento 1, 50.000x; (e) expermento 2, 50.000x; (f) experimento 3, 50.000x.

A Figura 4.3 ressalta que nanopartículas foram bem formadas em todos os 3 experimentos do ponto central. Contudo, evidencia-se também a formação de aglomerados de nanopartículas. Tal observação indica que, possivelmente, partículas de maior diâmetro que possam ser identificadas nas análises de DLS sejam resultado de um complexo de aglomerados de nanopartículas. Tal formação de aglomerados também explica a queda de conversão observada em alguns experimentos, uma vez que os aglomerados tendem a se depositar no fundo do reator, o que torna a suspensão, mesmo em agitação contínua, heterogênea, impedindo a retirada de alíquotas de maneira uniforme e representativa. É possível notar também que as partículas formadas nos experimentos de ponto central apresentam tamanho médio em torno de 300 nm. Na Figura 4.4 são apresentadas as micrografias das nanopartículas produzidas nas demais condições do plano experimental à base de azitromicina. Ao observar a Figura 4.4a e 4.4b é possível perceber que o experimento 4, em que foi utilizada quantidade reduzida de azitromicina e maior quantidade de surfactante, não resultou em aglomerações de partículas. Além disso, as nanopartículas produzidas apresentaram diâmetro médio em torno de 200 nm, ou seja, tamanhos menores do

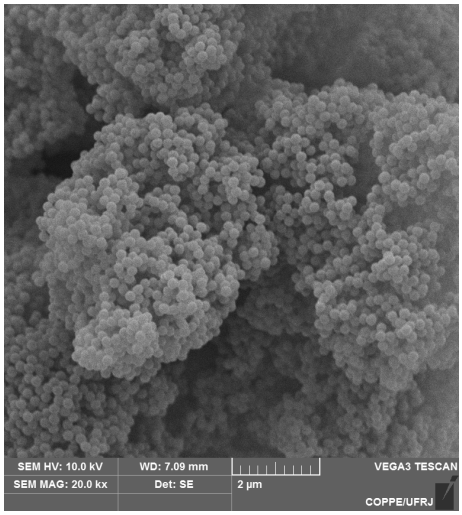
que os obtidos no experimento do ponto central, possivelmente em função da maior concentração de surfactante. Vale pontuar também que houve formação de partículas com uma morfologia bastante similar, possivelmente em decorrência da alta concentração de surfactante na superfície das nanopartículas. Em relação ao experimento 5, é possivel notar nas Figuras 4.4c e 4.4d que há formação de aglomerados, apesar da maior concentração de surfactante. Como mencionado, no experimento 6 houve uma desestabilização da reação de polimerização do MMA, resultando na formação de grandes aglomerados e também de nanopartículas em suspensão com diâmetros bastante variados, como mostrados nas Figuras 4.4e e 4.4f.Tal resultado reforça que a adição da azitromicina provocou uma diminuição na velocidade de reação do MMA e, possivelmente, causou um aumento do tempo para coalescência das gotas e partículas, resultando na formação de grandes aglomerados poliméricos. As micrografias do experimento 7 são também mostradas na Figura 4.4g e 4.4h. Nota-se que, apesar da quantidade reduzida de azitromicina, ainda houve formação de aglomerados, diferentemente do experimento 4. Esse efeito demonstra que há uma quantidade mínima de surfactante necessária para que não haja formação de aglomerados de partículas, pois, conforme foi visto anteriormente, a azitromicina afeta a cinética de polimerização do MMA, interferindo também na estabilidade da emulsão.


SEM HV: 10.0 kV
WD: 7.32 mm
VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 20.0 kx
Det: SE
2 µm
COPPE/UFRJ

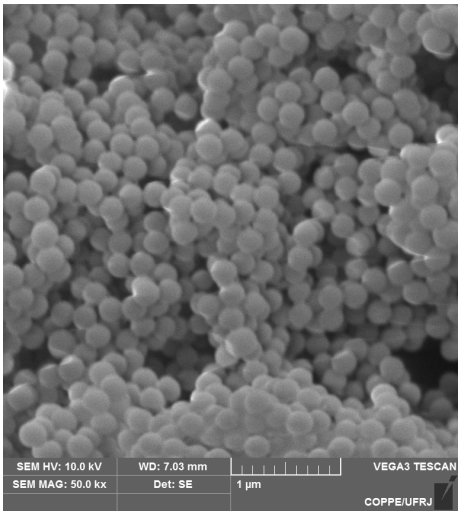
(a)


SEM HV: 10.0 kV
WD: 7.32 mm
VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 50.0 kx
Det: SE
1 µm
COPPE/UFRJ

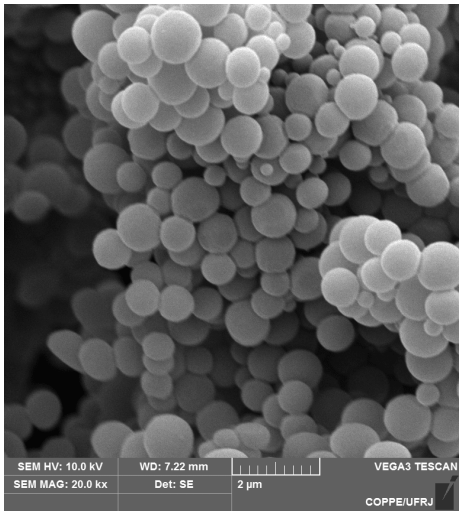
(b)


SEM HV: 10.0 kV
WD: 7.09 mm
VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 20.0 kx
Det: SE
2 µm
COPPE/UFRJ

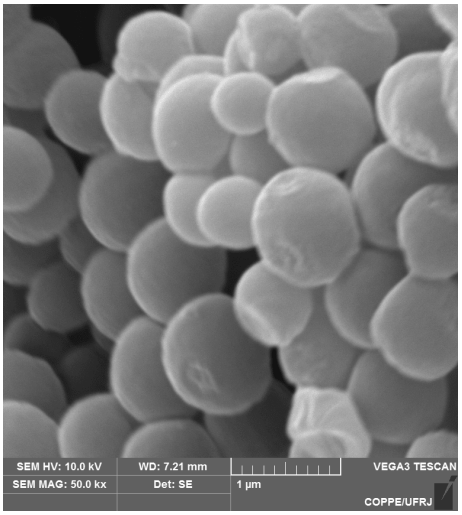
(c)


SEM HV: 10.0 kV
WD: 7.03 mm
VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 50.0 kx
Det: SE
1 µm
COPPE/UFRJ

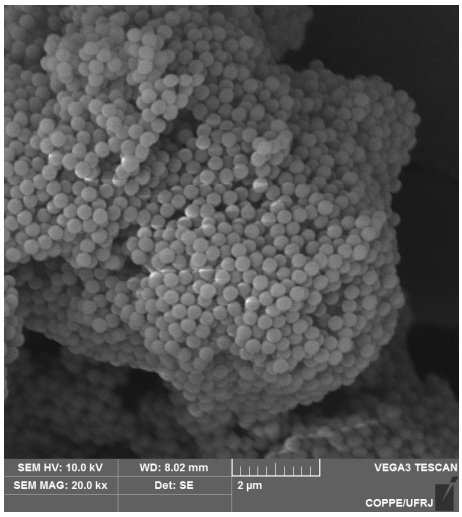
(d)


SEM HV: 10.0 kV
WD: 7.22 mm
VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 20.0 kx
Det: SE
2 µm
COPPE/UFRJ

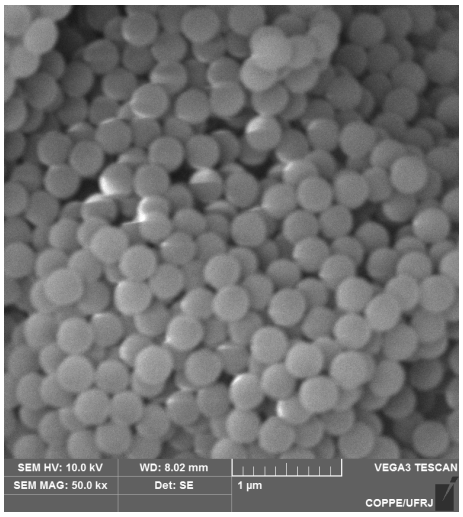
(e)


SEM HV: 10.0 kV
WD: 7.21 mm
VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 50.0 kx
Det: SE
1 µm
COPPE/UFRJ

(f)



(g)



(h)

Figura 4.4: Micrografias das partículas produzidas em cada uma das condições do plano experimental: (a) experimento 4, 20.000x; (b) experimento 4, 50.000x; (c) experimento 5, 20.000x; (d) experimento 5, 50.000x; (e) experimento 6, 20.000x; (f) experimento 6, 50.000x; (g) experimento 7, 20.000x; (h) experimento 7, 50.000x.

Distribuição de Tamanhos de Partícula

As distribuições de tamanhos de partícula e os diâmetros médios de partícula foram obtidos por meio da técnica de DLS, como descrito na seção anterior. Com base nos resultados discutidos anteriormente, espera-se que as distribuições de tamanhos de partícula sejam mais largas nos experimentos que contenham maiores concentrações de azitromicina. Na Figura 4.5 são apresentados os resultados de distribuição de tamanhos de partícula dos materiais produzidos no plano experimental à base de azitromicina e na condição do ponto central (é mostrada a média do ponto central).

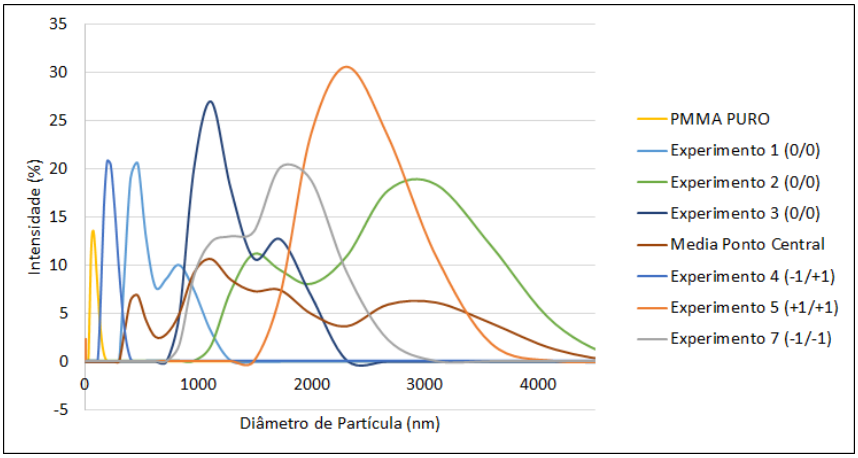


Figura 4.5: Distribuição de tamanhos de partícula do plano experimental à base de azitromicina e dos experimentos do ponto Central.

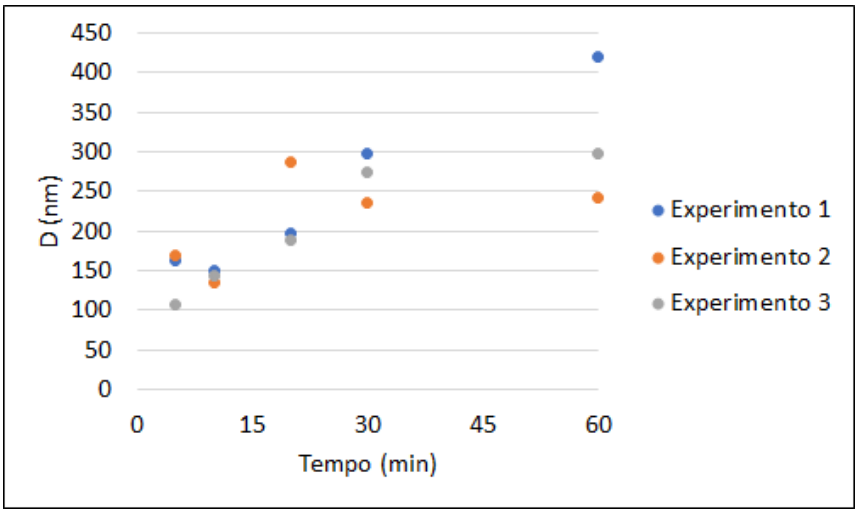
Ao observar a Figura 4.5, percebe-se que o experimento 4 (-1/+1) apresentou a

distribuição de tamanhos de partícula mais estreita e próxima à curva do PMMA puro. Tal resultado ressalta o caráter promissor da condição experimental estudada, uma vez que para as aplicações *in vivo* almejadas no presente trabalho é necessário que os materiais apresentem curvas de distribuição mais estreitas e índices de polidispersão baixos, estando o mais próximos possível a 1.Nota-se também que é necessária a adição de uma quantidade ótima de surfactante para garantir a estabilidade da emulsão, visto que o experimento 7 (-1/-1) apresentou um deslocamento das curvas de distribuição para a diâmetros maiores, correspondendo a aumento pronunciado nos tamanhos de partícula. O comporta- mento bimodal também é observado em todos os demais experimentos, com exceção do experimento 4 (-1/+1). Dessa forma, evidencia-se o efeito da azitromicina na cinética de polimerização e, consequentemente, na morfologia das partículas.

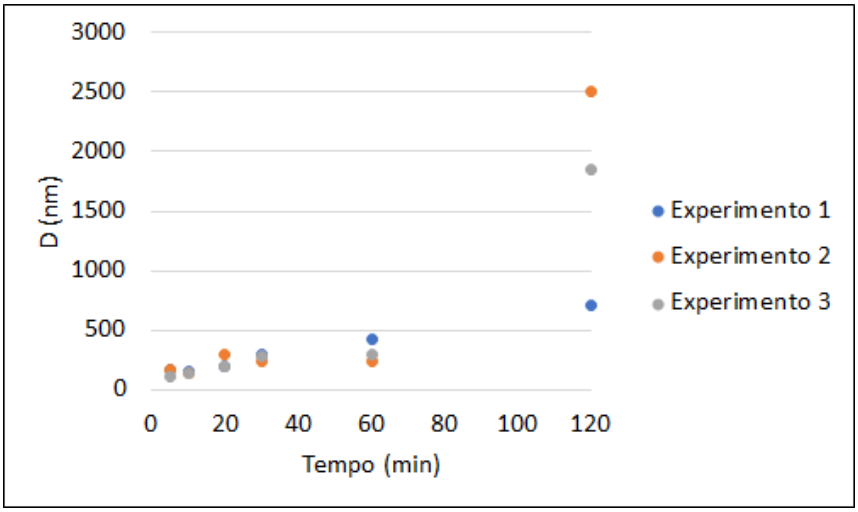
Não foi possível obter curva de distribuição de tamanhos de partícula pela técnica adotada para o experimento 6 (+1/-1), em função da desestabilização da emulsão e da formação de grandes aglomerados. A Figura 4.6 mostra o material obtido ao final do experimento.

Figura 4.6: Fotografia dos aglomerados obtidos ao final do experimento 6.

Na Figura 4.7 é possível observar os diâmetros médios obtidos para as partículas produzidas a partir dos experimentos do ponto central. Nota-se que os três experimentos resultaram em partículas com diâmetros médios bem próximos até o tempo de 30 minutos de reação. Após este período, maior discrepância é observada entre os valores médios de diâmetro, sugerindo que as aglomerações se intensificam após esse momento da reação e dificultando uma amostragem representativa do meio reacional, em função da elevada heterogeneidade. Nesse sentido, os valores elevados de diâmetro médio de partícula ao final dos experimentos estão relacionados possivelmente àsa aglomerações provocadas pela adição de azitromicina no meio. Vale pontuar que todos os dados obtidos são apresentados no Apêndice B



(a)



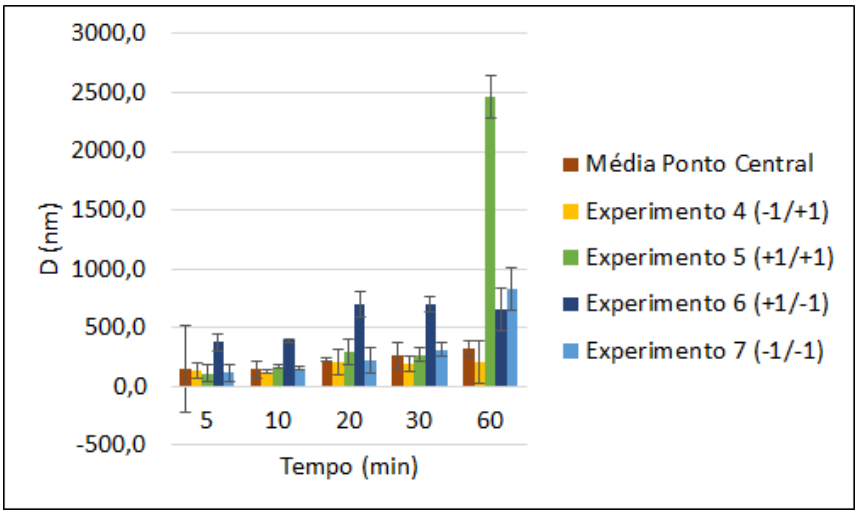
(b)

Figura 4.7: Diâmetros médios dos experimentos do ponto central: (a) diâmetros médios até 60 minutos; (b) diâmetros médios até 120 minutos.

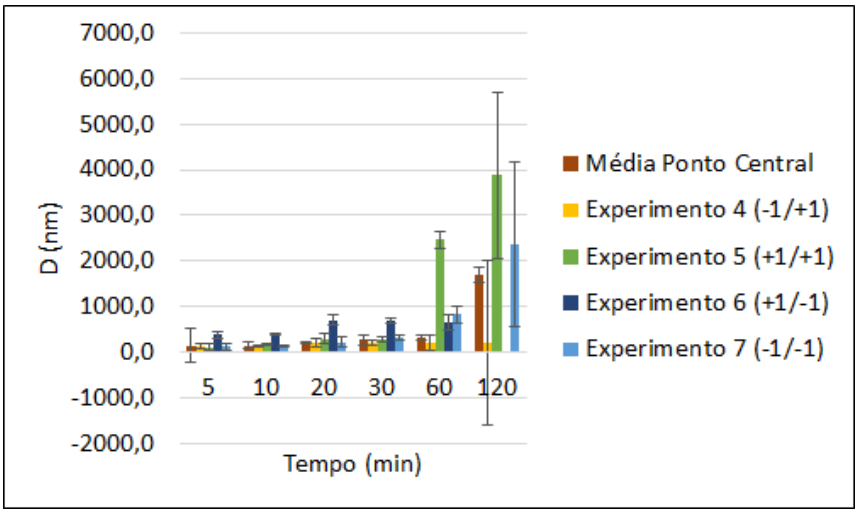
Na Figura 4.8 são apresentados os diâmetros médios de partícula acompanhados dos erros experimentais (calculados com base nas tréplicas do ponto central), juntamente com a média dos diâmetros do ponto central. É importante ressaltar que o diâmetro médio de partícula obtido no tempo de 60 minutos para o experimento 1 apresentou diferença significativa em relação aos outros dois experimentos do ponto central. Por conta desse efeito, para o cálculo dos valores do erro experimental, foi desconsiderado o experimento 1, para os tempos de 60 e 120 minutos.

Em função do efeito de aglomeração, após 30 minutos de reação, os erros experimentais observados para os valores dos diâmetros médios são bastante pronunciados. Com base apenas nesta análise e observando apenas os resultados de diâmetro médio obtidos ao longo de 120 min de reação, seria inadequado concluir algum efeito do teor de surfactante ou do fármaco, uma vez que os valores de diâmetro médio são estatisticamente semelhantes. Dessa maneira, ressalta-se a importância de realizar

uma análise estatística dos dados coletados e também não se basear apenas em um dado obtido. A partir de todas as análises realizadas, nota-se uma limitação dessa análise específica do diâmetro médio de partícula para avaliar o efeito das variáveis de entrada. Neste caso, a análise das curvas completas de distribuição de tamanhos é essencial para avaliar o efeito de cada uma das variáveis, como discutido anteriormente.



(a)



(b)

Figura 4.8: Diâmetros médios de partícula dos materiais produzidos a partir dos experimentos do plano e ponto central: (a) após 60 min de reação; (b) após 120min de reação.

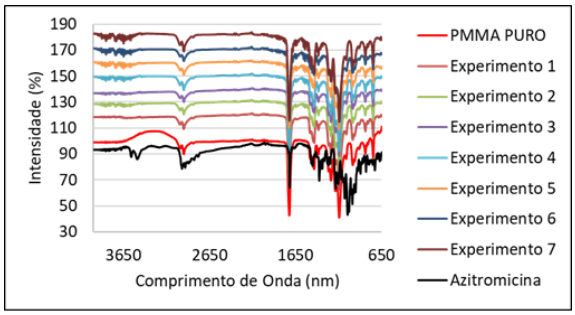
Em função do efeito de aglomeração, após 30 minutos de reação, os erros experimentais observados para os valores dos diâmetros médios são bastante pronunciados. Com base apenas nesta análise e observando apenas os resultados de diâmetro obtidos após 120 min de reação, seria inadequado concluir algum efeito do teor de surfactante ou do fármaco, uma vez que os valores de diâmetro médio são estatis-

ticamente semelhantes. Dessa maneira, ressalta-se a importância de realizar uma análise estatística dos dados coletados e também não se basear apenas em um dado obtido. A partir de todas as análises realizadas, nota-se uma limitação dessa análise específica do diâmetro médio de partícula para avaliar o efeito das variáveis de entrada. Neste caso, a análise das curvas completas de distribuição de tamanho são essenciais para avaliar o efeito de cada uma das variáveis, como mostrado anteriormente.

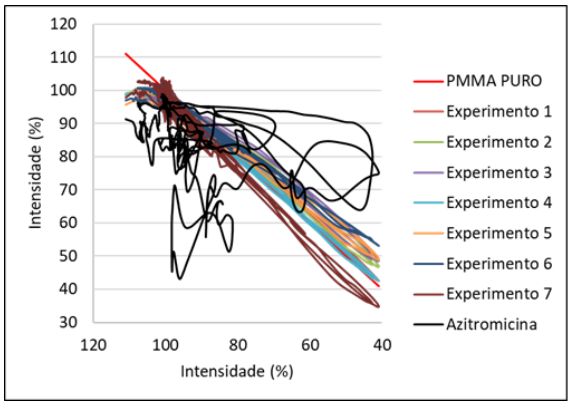
4.1.3 Influência na Composição das Nanopartículas Poliméricas

Estrutura Química

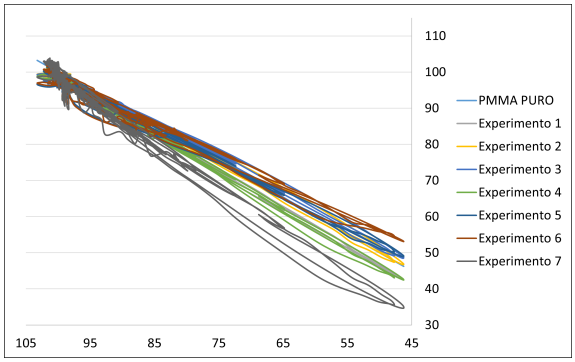
A análise da composição das nanopartículas poliméricas é de grande importância para que seja possível, por exemplo, compreender o mecanismo de interação entre a azitromicina e o sistema polimérico e avaliar se a azitromicina é incorporada ou não à cadeia polimérica de PMMA. Nesse âmbito, foram conduzidas análises de FTIR e os resultados obtidos são mostrados na figura 4.9bCada um dos espectros obtidos são apresentados no Apêndice C. Foram avaliados também os espectros da nanopartícula de PMMA puro e o espectro da azitromicina. Os espectros da azitromicina e do PMMA puro são relevante para compreender a composição química da superfície das nanopartículas no que se refere aos grupamentos funcionais presentes e à possível interação química entre a azitromicina e as cadeias de PMMA. Os resultados obtidos são mostrados na Figura4.9a e 4.9b. É importante ressaltar que a Figura 4.9b foi elaborada correlacionando as intensidades dos picos de cada espectro com as intensidades dos picos do espectro de PMMA puro. Dessa maneira, busca-se identificar de maneira mais clara as discrepância entre os resultados obtidos. Caso não hava uma diferença significativa entre as curvas, espera-se obter retas com alto coeficiente de correlação.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.9: Espectros de FTIR das amostras produzidas na presença de azitromicina: (a) espectros de cada um dos experimentos; (b) correlação entre as intensidades dos picos de cada um dos espectros dos materiais e as intensidades dos picos do PMMA puro; (c) correlação entre as intensidades dos picos dos espectros dos materiais e as intensidades dos picos do PMMA puro excluindo a Azitromicina.

Ao observar as Figuras 4.9a, 4.9b e 4.9c, inicialmente, percebe-se que oos espectros dos pontos centrais possuem alto grau de semelhança e se aproximam do espectro do PMMA puro. Na Figura 4.9b nota-se que a maior parte das curva obtidas se aproximam de retas; os desvios observados em relação à curva vermelha, correspondente ao PMMA, ocorrem em função das mudanças na linha de base durante a condução das análises. A similaridade da estrutura dos materiais produzidos é evidenciada pela curva da azitromicina, em que se mostra o quão distinto é o fármaco estudado em relação ao PMMA. Dessa forma, tal resultado indica a presença pouco significativa do fármaco nas regiões mais superficiais das nanopartículas produzidas. Ao avaliar os espectros dos materiais obtidos, percebe-se também que não há aparentemente alterações significativas em função do aumento da quantidade de azitromicina adicionada no meio, não sendo possível afirmar se o fármaco interage quimicamente com a cadeia polimérica ou encontra-se disperso na matriz. Em função da baixa concentração de surfactante no meio, não seria esperado qualquer alteração na composição da matriz polimérica, em função do aumento da concentração de tal composto, como foi observado. A Figura 4.9c mostra que as curvas se

aproximam de uma reta, o que configura a proximidade com o PMMA puro. Dessa forma, por meio dessa técnica, não é possível comprovar a presença da azitromicina na superfície.

Nesse sentido, nota-se que, apesar de interferir fortemente na cinética de polimerização do MMA, a azitromicina pareceu não afetar de maneira relevante os grupamentos químicos da estrutura polimérica presentes na superfície das nanopartículas, visto que as bandas características encontradas nos experimentos são as mesmas daquelas observadas no FTIR do PMMA puro.

Distribuição de Tamanhos das Cadeias Poliméricas

Com base nos pontos que foram apresentados até esta seção, percebe-se que a azitromicina interfere na cinética da reação de polimerização e que, provavelmente, por reduzir a velocidade de reação, provocou um aumento da aglomeração das nanopartículas, resultando em curvas de distribuição de tamanhos mais largas e em diâmteros médios de maior valor. Dessa forma, a azitromicina afeta a morfologia das partículas. Contudo, também é importante investigar se o fármaco afeta a estrutura química dos polímeros. Para isso, além de FTIR, também foram conduzidas análises de cromatografia de permeação em gel (GPC) . Os resultados obtidos para as distribuições de tamanho das cadeias poliméricas são apresentados na Figura 4.10. Os valores das massas molares médias (Mn e Mw) e do índice de polidispersão são mostrados na tabela 4.1.

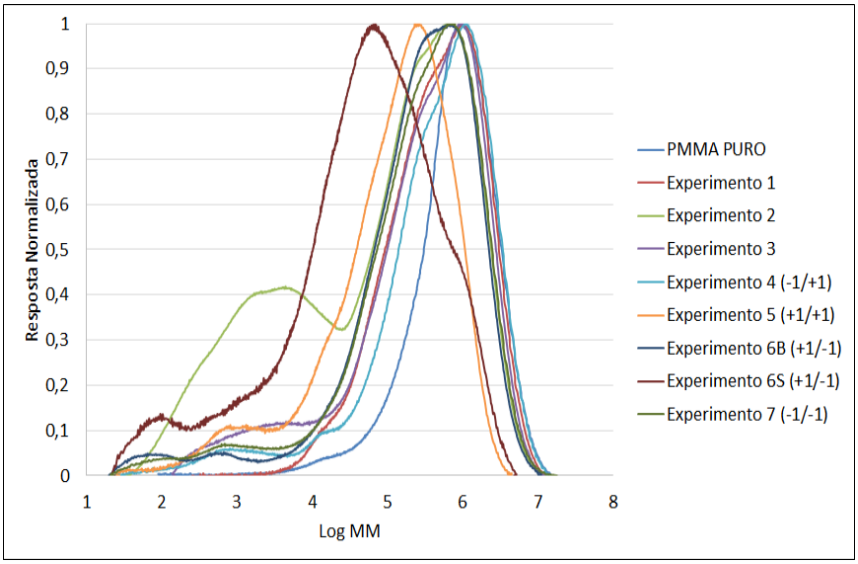


Figura 4.10: Distribuição de tamanhos das cadeias poliméricas das nanopartículas contendo azitromicina.

Tabela 4.1: Massas molares médias (Mn e Mw) e Índice de Polidispersão (PDI).

Experimento	Mn (Da)	Mw (Da)	Índice de Polidispersão
PMMA PURO	204.731	916.117	4,47
Exp. 1	45.382	712.368	15,7
Exp. 2	1.511	338.928	224,3
Exp. 3	7.368	607.148	82,4
Exp. 4 (-1/+1)	4.086	796.337	194,9
Exp. 5 (+1/+1)	1.956	225.922	115,5
Exp. 6B (+1/-1)	3.874	500.401	129,2
Exp. 6S (+1/-1)	2.309	180.370	78,1
Exp. 7 (-1/-1)	4.826	543.004	112,5

Nota-se que o PMMA puro apresenta uma curva de distribuição de tamanhos de cadeias relativamente estreita. Os demais experimentos, conduzidos na presença de azitromicina, apresentaram um alargamento das curvas de ditribuição de tamanhos de cadeia e um aumento de cadeias poliméricas de menor tamanho. Foram conduzidas duas análises dos dois materiais produzidos a partir de experimento 6: materiais que aglomeraram e sedimentaram (identificados pela letra "B"); materiais particulado do sobrenadante (identificados pela letra "S"). Dessa forma, pode-se observar que nos experimentos em que foi inserida uma maior quantidade de azitromicina, os efeitos de encurtamento das cadeias poliméricas são mais pronunciados. Além disso, é possível notar também que o pico caracterísco observado no PMMA puro é deslocado para a esquerda, nos experimentos com maior concentração de azitromicina. Dessa forma, os resultados indicam que a azitromicina atua como um possível agente de transferência de cadeia, resultando em cadeias poliméricas de menor massa molar.

Comportamento semelhante é observado ao analisar a Tabela 4.1. Percebe-se que a adição da azitromicina provoca uma diminuição das massas molares médias, Mn e Mw, e um aumento pronunciado do índice de polidispersão. Tais resultados corroboram o efeito da azitromicina como agente de transferência de cadeia nas reações de polimerização do MMA.

Degradação Térmica

Além dos resultados de cromatografia, os perfis de decomposição térmica, obtidos por meio de análises termogravimétricas, também auxiliam na compreensão sobre a influência da azitromicina nas cadeias poliméricas de PMMA. A Figura 4.11 mostra os resultados obtidos para as nanopartículas na presença do fármaco.

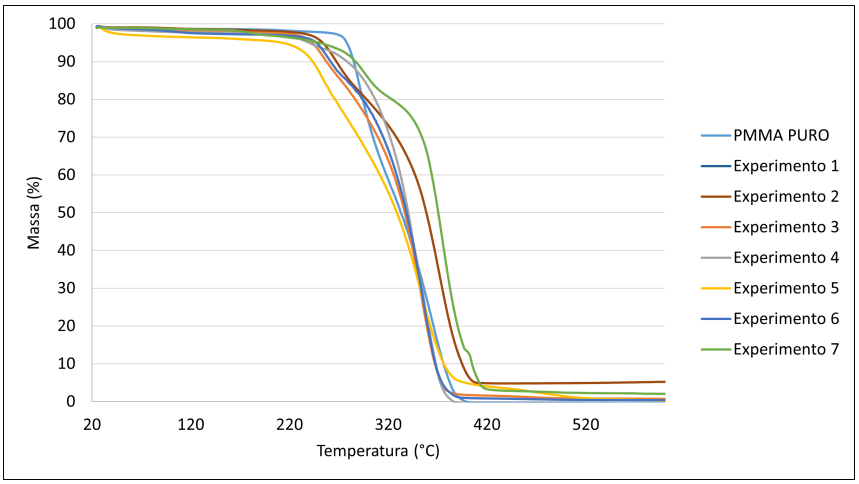


Figura 4.11: Análise termogravimétrica das nanopartículas produzidas na presença de azitromicina

É possível notar na Figura 4.11, uma tendência nos experimentos que contém azitromicina o início da degradação térmica a menores a temperaturas, ao comparar com os resultados do PMMA puro. É sabido que as cadeias poliméricas menores de um mesmo polímero se decompõem a temperaturas mais baixas. No entanto, tal efeito também pode ser consequência da incorporação do fármaco na matriz. Dessa forma, apesar de tal efeito necessitar de uma análise mais aprofundada, há indícios de que a adição de azitromicina pode ter provocado um aumento de cadeias poliméricas de menor tamanho. Além disso, as curvas de decomposição das nanopartículas com azitromicina apresentam faixas de decomposição térmica, indicando que partículas com tamanhos distintos de massa molar foram produzidas, reforçando a atuação da azitromicina como agente de transferência de cadeia.

4.1.4 Eficiência de Encapsulamento da Azitromicina nas Nanopartículas de PMMA

Para avaliar a eficiência de encapsulamento da azitromicina nas nanopartículas, foram realizadas análises de RMN, sendo comparados os espectros de PMMA e dos polímeros produzidos e buscando-se identificar os picos não sobrepostos. É importante pontuar que apenas os polímeros contendo a maior e menor concentração de azitromicina foram avaliados. Conforme mostrado na Figura 4.12 o pico de hidrogênio 1H da metila A da azitromicina foi utilizado como referência em função da falta de sobreposição com outros sinais.

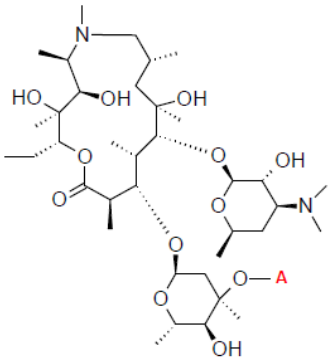


Figura 4.12: Metila A da Azitromicina.

No caso do PMMA, o sinal de referência para cálculo foram os hidrogênios 1H da metila (O-CH_3) cujo pico característico foi identificado em 3,60 ppm. Na Azitromicina o pico característico da metila A é encontrado em 3,35 ppm. A Figura 4.13 apresenta o espectro do PMMA puro.

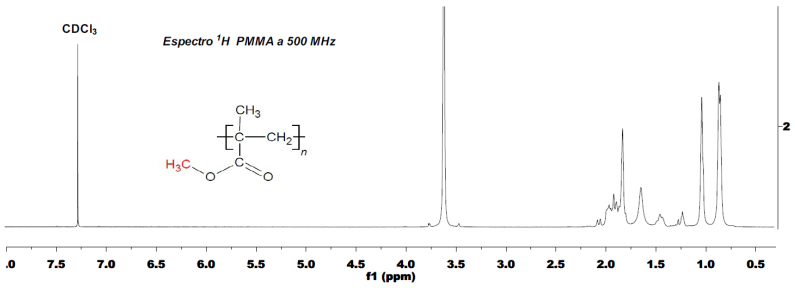
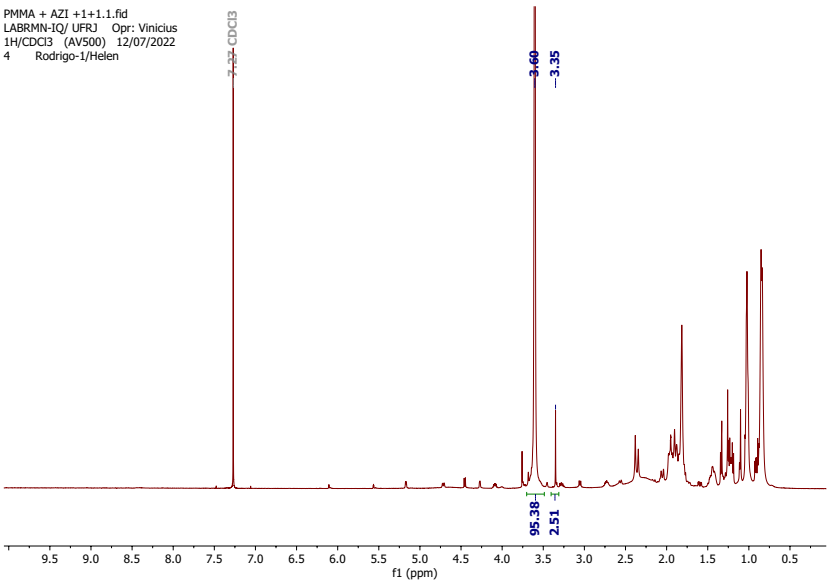


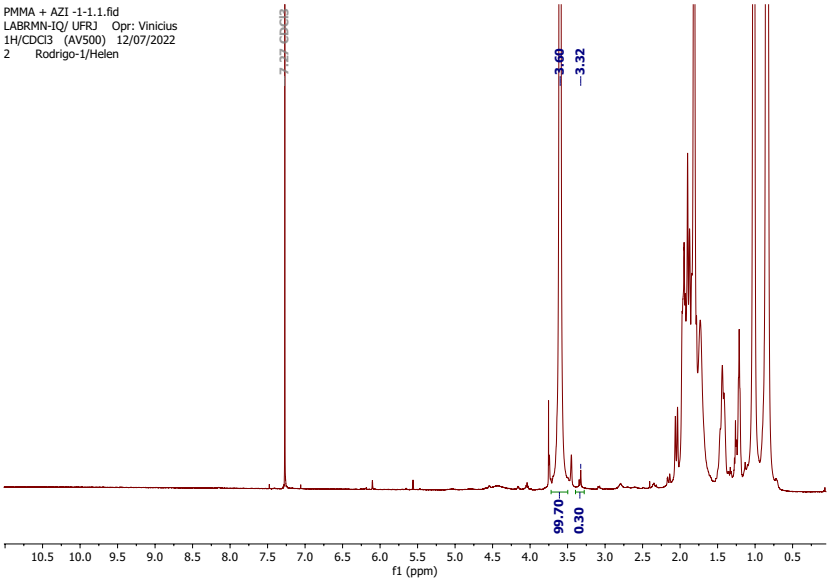
Figura 4.13: Espectro de RMN do PMMA puro.

Nesse âmbito, a partir da análise dos espectros das nanopartículas produzidas, foi possível calcular o teor de azitromicina presente em cada uma das amostras: amostra (+1/+1),teor de azitromicina igual a 2,51%; amostra (-1/-1), teor de azitromicina igual a 0,30%. Na figura 4.14 são apresentados os espectros analisados de cada uma das amostras.

Sabe-se que a relação entre os picos é baseada na massa de material. Dessa forma, foi possível calcular que a eficiência de encapsulamento para o experimento (+1/+1) foi de 33,5% e igual a 12% para o experimento (-1/-1). Nota-se assim que o aumento no teor de azitromicina adicionada à reação resultou em um aumento da eficiência de encapsulamento. No entanto, tal condição de reação também resultou na formação de aglomerados poliméricos. Observa-se também uma perda significativa de fármaco não encapsulado. Dessa forma, um estudo mais aprofundado deverá ser conduzido de maneira a avaliar a máxima eficiência de encapsulamento de maneira a garantir a estabilidade da emulsão.



(a)



(b)

Figura 4.14: Espectros de RMN das amostras de azitromicina: (a) experimento +1/+1; (b) experimento -1/-1.

4.1.5 Ensaio de Liberação

Buscou-se avaliar o perfil de liberação da azitromicina a partir das amostras de nanopartícula. No entanto, não foi possível conduzir uma análise qualitativa em função das restrições identificadas para a análise UV-vis, disponível para condução de tal caracterização. , O espectofotômetro de UV visível que foi utilizado para análise possui intervalo de medição de comprimento de onda entre 200 e 300 nm, e o comprimento de onda máximo da azitromicina é inferior aos 200 nm na leitura do

equipamento, o que torna limita uma análise precisa de tais amostras. A Figura 4.15 apresenta as faixas de absorção da azitromicina no UV em diferentes concentrações do fármaco. Vale pontuar que todos os dados brutos relacionados ao ensaio de liberação são apresentados no Apêndice D.

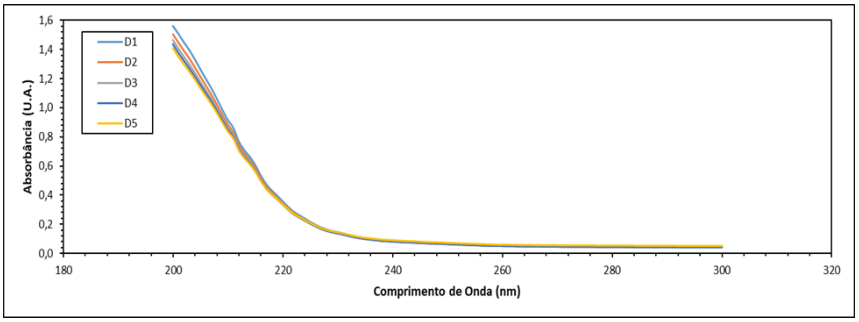


Figura 4.15: Avaliação da faixa de absorção no UV da azitromicina em diferentes comprimentos de onda, em diferentes concentrações do fármaco.

Ao avaliar a metodologia mais apropriada para quantificar a azitromicina liberada nos meios de referência, notou-se a ausência de um método específico e eficaz para quantificar tal composto. Dessa maneira, foi adotada uma metodologia de análise por UV-Vis de forma a avaliar, ao menos, qualitativamente tal liberação. Assim, apesar da imprevisão quantitativa dos resultados, seguiu-se com os experimentos, de forma a avaliar a possível liberação dos medicamentos das nanopartículas. Para isso, foram selecionados os materiais produzidos na condição (+1/+1) em que houve maior adição de azitromicina e garantiu-se a estabilidade das partículas. A Figura 4.16 apresenta, então, os perfis de liberação da azitromicina ao longo das 5 horas de experimento. É possível perceber o aumento da intensidade do pico relacionado à azitromicina na solução do sobrenadante ao longo do tempo, indicando que tal ativo foi encapsulado e é liberado das nanopartículas. Entretanto, faz-se necessário um estudo futuro que investigue uma técnica de caracterização adequada para quantificar a liberação de azitromicina.

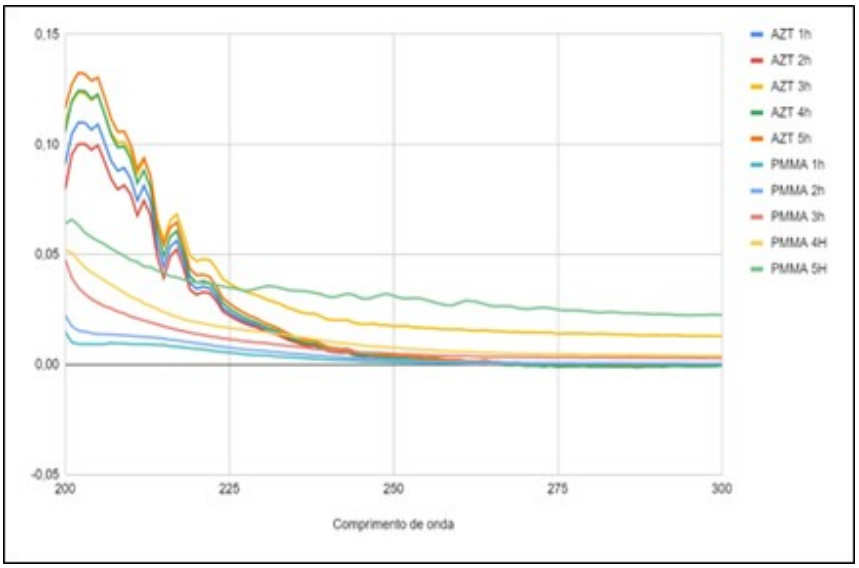


Figura 4.16: Perfis de liberação da azitromicina da matriz de PMMA ao longo das 5h de experimento.

4.2 Encapsulamento do Naproxeno

4.2.1 Influência na Conversão

O plano experimental focado no encapsulamento do fármaco naproxeno foi conduzido de maneira satisfatória e as reações foram realizadas com sucesso. Novamente, para calcular o erro experimental em cada tempo de reação, foram realizadas triplicatas no ponto central. Na Figura 4.17 são apresentadas as conversões dos três experimentos conduzidos na condição do ponto central na presença do naproxneo. Vale pontuar que os dados de conversão do ponto central e do restante do plano experimental na presença do fármaco naproxeno são apresentados no 5.1.

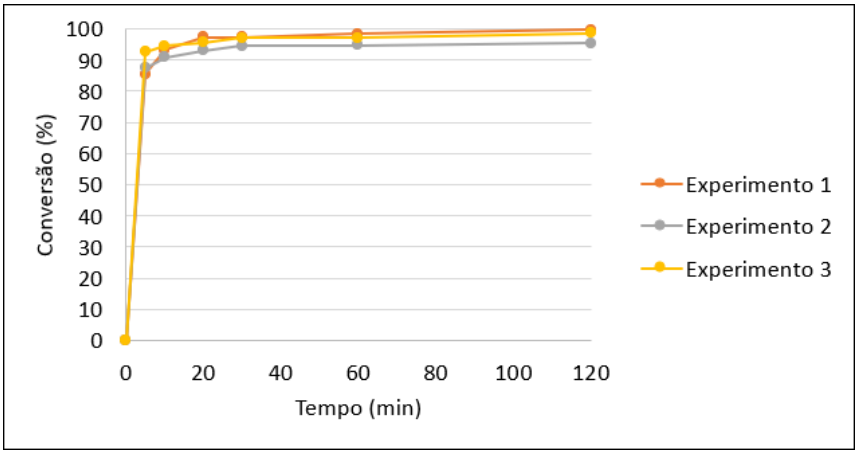


Figura 4.17: Cinética de polimerização do MMA na presença de naproxeno no ponto central.

Ao avaliar a Figura 4.17, nota-se que os perfis de conversão obtidos para os experimentos conduzidos nas condições do ponto central foram bastante semelhantes. Além disso, são obtidas as conversões próximas a 100% em aproximadamente 30 min de reação. velocidades altas de reação. Diferentemente do plano experimental da azitromicina, as reações de encapsulamento do naproxeno não indicam a existência de uma heterogeneidade do meio reacional, uma vez que conversões muito similares foram obtidas ao longo de toda reação de polimerização do MMA.

Na Figura 4.18 são apresentadas a cinética de polimerização do PMMA puro, a média de conversão do MMA dos experimentos do ponto central ao longo da reação e as conversões dos demais experimentos do plano experimental ao longo do tempo. É importante pontuar que, novamente, os erros experimentais calculados a partir dos experimentos do ponto central foram considerados os mesmos para cada tempo de cada um dos experimentos do plano experimental do naproxeno.

Nota-se que, para os diferentes experimentos, conversões elevadas, acima de 90%, são obtidas após apenas 30 min de reação. É possível também que, aparentemente, a adição de naproxeno no meio reacional provoque uma leve diminuição na velocidade de reação do MMA no início da reação, uma vez que conversões mais baixas foram obtidas para os experimentos (+1/+1) e (+1/-1) após 5 min de reação. Conversão mais baixa também foi obtida para o experimento contendo menor concentração de surfactante, uma vez que um menor número de nanogotas são formadas, havendo uma queda na velocidade de reação. No entanto, é relevante pontuar que tal influência do fármaco na conversão de MMA não é significativa, uma vez que a cinética de polimerização do MMA puro apresenta um perfil estatisticamente similar à cinetica observada nas condições do ponto central.

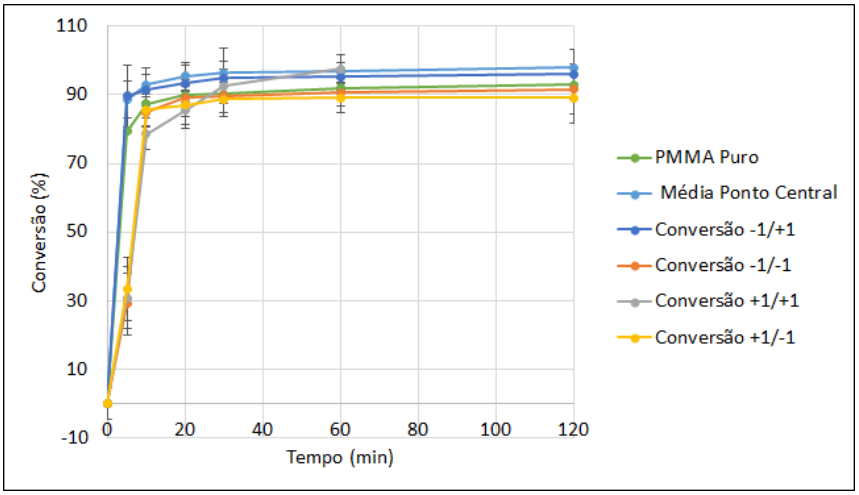
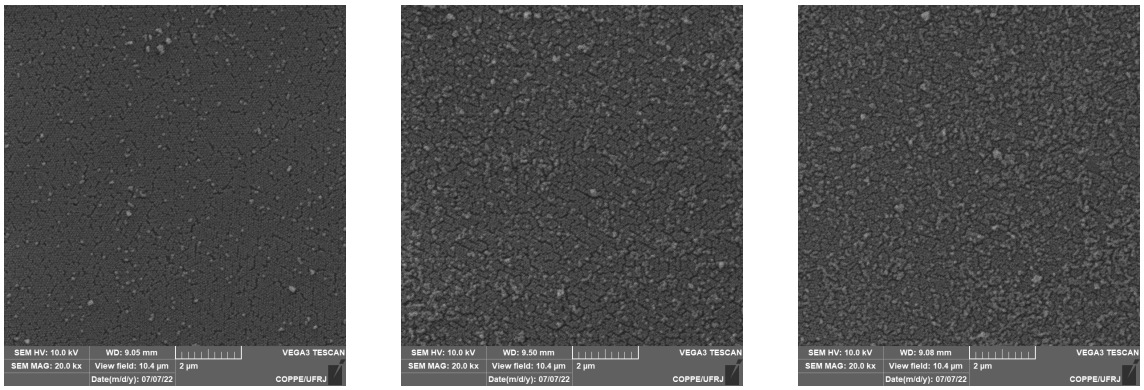


Figura 4.18: Conversões do plano experimental à base de naproxeno.

4.2.2 Influência na Morfologia

Micrografias

A morfologia das nanopartículas produzidas na presença do fármaco naproxeno também foi analisada. Para isso, diversas análises de MEV foram realizadas. Na figura 4.19 são mostradas as micrografias dos experimentos conduzidos nas condições do ponto central. É possível observar que as nanopartículas contendo naproxeno são consideravelmente menores ao comparar com as nanopartículas contendo o fármaco azitromicina, com tamanhos próximos a 50 nm. Além disso, nota-se a ausência de aglomerados poliméricos. Nesse âmbito, sugere-se que a menor influência do naproxeno na cinética de polimerização do MMA garante uma maior estabilidade da emulsão formada e, consequentemente, das nanopartículas produzidas.



(a) (b) (c)

Figura 4.19: Micrografias das partículas produzidas nos experimentos do ponto central: (a) experimento 1, 20.000x; (b) expermento 2, 20.000x; (c) experimento 3, 20.000x.

As micrografias das nanopartículas produzidas nas demais condições do plano experimental são mostradas na Figura 4.20. Não foi obsercada uma interferência significativa do naproxeno no tamanho das partículas obtidas. Além disso, para as diferentes condições investigadas, não houve formação de aglomerados. Ademais, ao observar a micrografia do experimento (+1/-1), percebe-se que a redução na concentração de surfactante possivelmente provocou um aumento no tamanho das partículas obtidas, como esperado, uma vez que a uma diminuição na estabilização das nanogotas formadas.

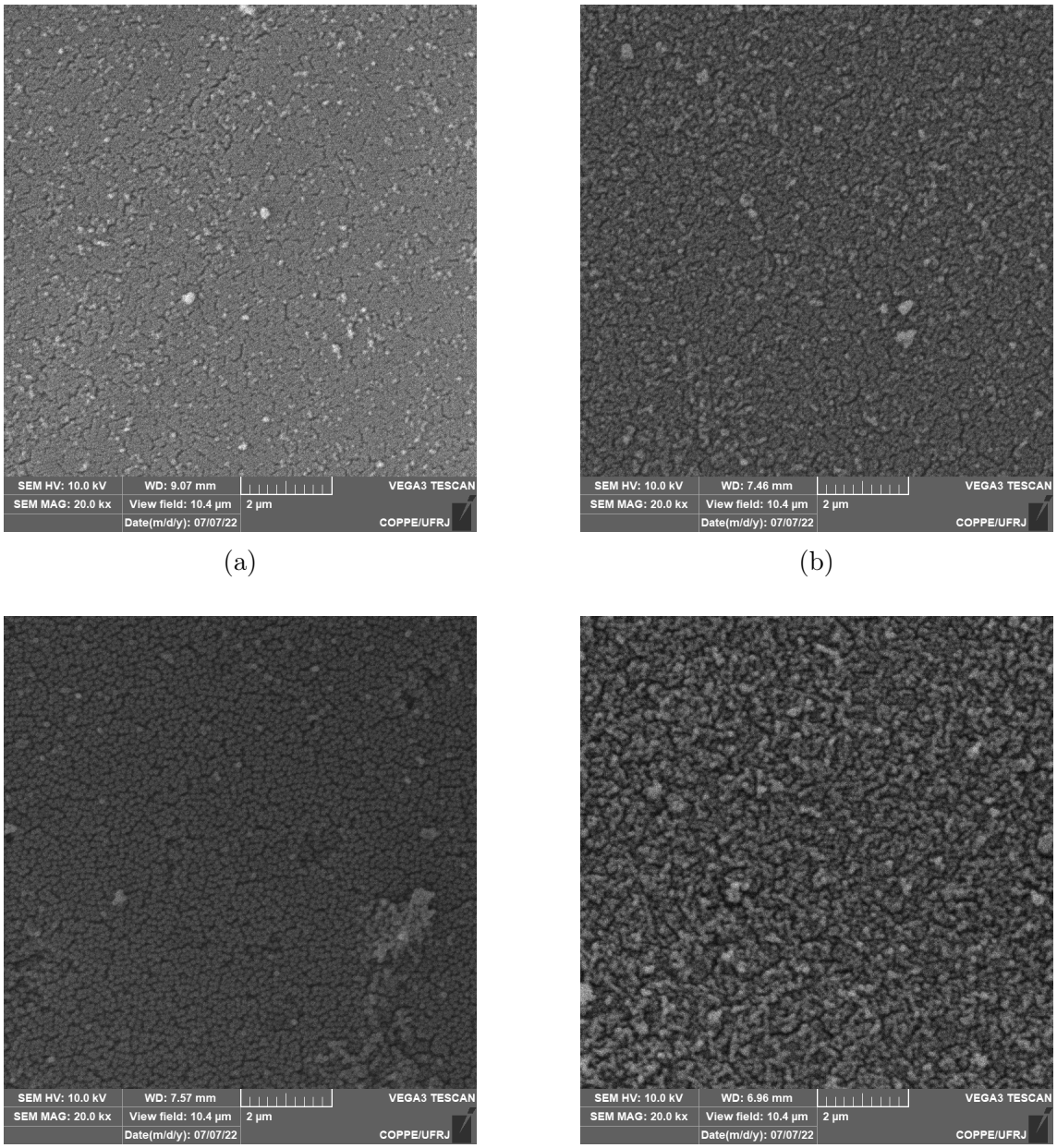


Figura 4.20: Micrografias das partículas produzidas em cada uma das condições do plano experimental: (a) experimento (-1/+1), 20.000x; (b) experimento (+1/+1), 20.000x; (c) experimento (-1/-1), 20.000x; (d) experimento (+1/-1), 20.000x.

Distribuições de Tamanho de Partícula

Os resultados obtidos quanto ao tamanho das nanopartículas produzidas são apresentados na Figura 4.21. A partir da análise das curvas, pode-se notar que, com exceção dos experimentos 6 e 7, as curvas de distribuição de tamanhos de partícula na presença de naproxeno tem um perfil muito similar. Tal resultado reforça que a adição de naproxeno não afeta de maneira pronunciada a morfologia das partículas produzidas. Observa-se, também, que as condições do ponto central resultam em

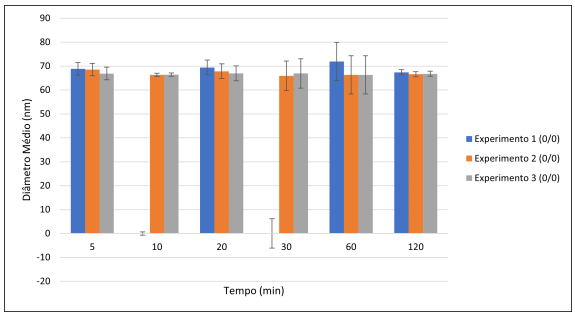


Figura 4.22: Diâmetros médios das nanopartículas produzidas a partir dos experimentos do ponto central.

perfis de distribuição um pouco mais largos, ao comparar com a distribuição de tamanhos de partícula do PMMA puro e do experimento (+1/+1), em que maior concentração de surfactante é adicionada ao sistema, resultando em maior estabilização de nanogotas. Os experimentos 6 e 7 apresentam um deslocamento das curvas de distribuição para diâmetros maiores, em função da menor concentração de surfactante no meio.

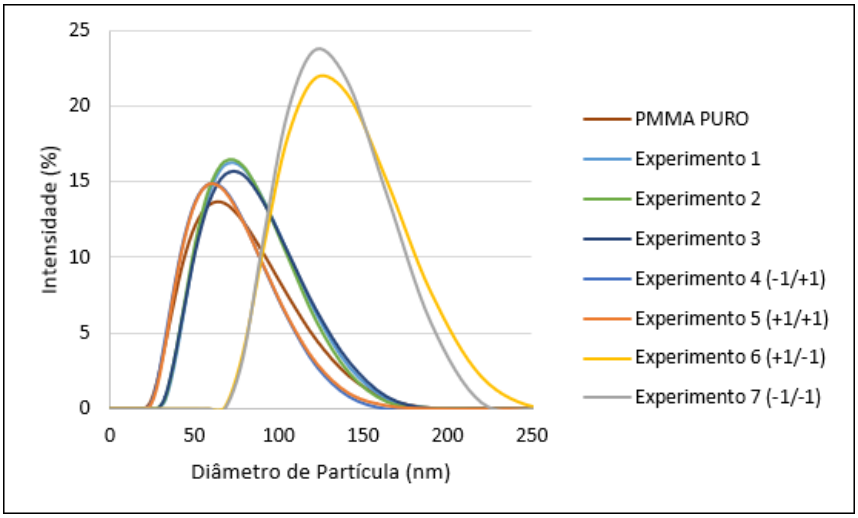


Figura 4.21: Distribuição de tamanhos de partícula do plano experimental à base de naproxeno e dos experimentos do ponto central.

Na Figura 4.23 são apresentados os diâmetros médios dos experimentos conduzidos no ponto central. Percebe-se que, para o naproxeno, há a formação de um meio reacional mais uniforme, sendo obtidos diâmetros médios similares para os diferentes experimentos realizados na condição do ponto central, conforme pode ser visto na Figura 4.22.

Os diâmetros médios de partícula obtidos para os diferentes experimentos são mostrados na Figura 4.23.

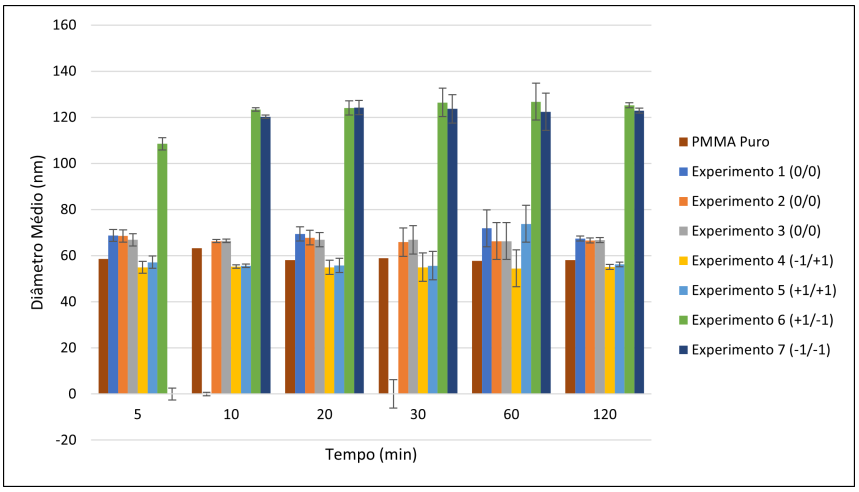


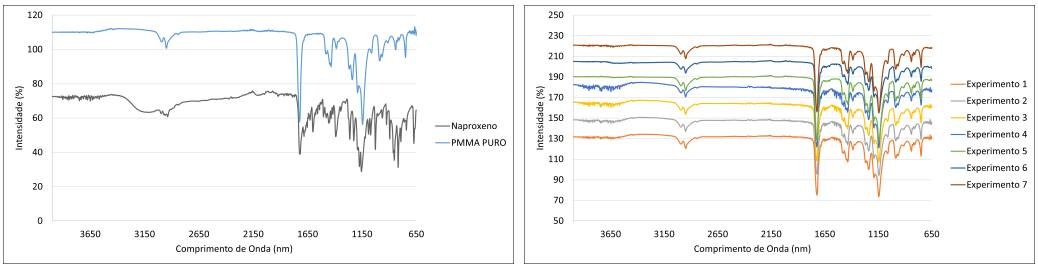
Figura 4.23: Diâmetros médios de partícula dos materiais produzidos a partir dos experimentos do plano experimental e ponto central, na presença de naproxeno.

Primeiramente, vale ressaltar que o valor de tamanho médio do experimento 7 no tempo de 5 minutos e do experimento 1 no tempo de 10 minutos foram retirados da Figura 4.23 por terem sido considerados *outliers* ao comparar com os demais resultados obtidos. Na Figura 4.23 observa-se também que os experimentos do ponto central possuem valores semelhantes ao longo de toda reação. Tal resultado reforça a baixa influência do naproxeno na cinética da reação e também a alta estabilidade da emulsão produzida. Dessa forma, a formação de nanogotas e consequentemente, de nanopartículas acontece nos minutos iniciais do experimento. Também é possível notar que, como observado nas curvas de distribuição, os experimentos nos quais menor concentração de surfactante foi adicionada resultaram em maiores tamanhos médios de partícula; paralelamente, nos experimentos nos quais maior concentração de surfactante foi adicionada, foram obtidos menores diâmetros médios de partícula.

4.2.3 Influência na Composição das Nanopartículas Poliméricas

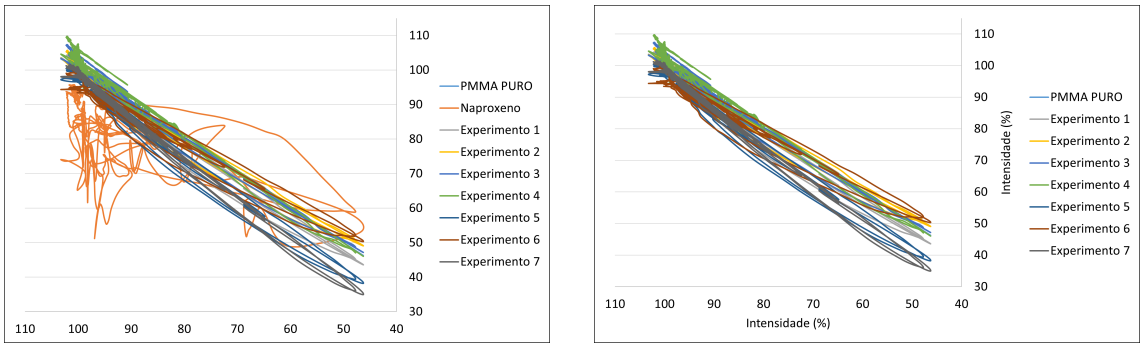
Estrutura Química

Como mencionado, os resultados da análise de FTIR são relevantes para avaliar a estrutura química das cadeias poliméricas da nanopartículas. De maneira semelhante ao que foi realizado para a azitromicina, realizou-se análise de FTIR a fim de investigar possíveis interações entre o naproxeno e o polímero na superfície da nanopartícula. A Figura 4.24 apresenta os espectros obtidos.



(a) (b)

Figura 4.24: Espectros de FTIR das amostras produzidas na presença de naproxeno: (a) espectros de naproxeno e PMMA; (a) espectros de cada um dos experimentos; (b) correlação entre as intensidades dos picos de cada um dos espectros dos materiais e as intensidades dos picos do PMMA puro.



(a) (b)

Figura 4.25: (a) correlação entre as intensidades dos picos dos materiais e do PMMA puro; (b) correlação entre as intensidades dos picos dos materias e do PMMA puro excluindo o naproxeno

Ao observar a Figura 4.24, percebe-se que os espectros de FTIR dos diferentes materiais produzidos são bastante semelhantes entre si e muito semelhantes ao espectro do PMMA puro. Dessa maneira, a partir da presente análise, não é possível afirmar de maneira inequívoca a presença de naproxeno na superfície das partículas.

Distribuição de Tamanhos das Cadeias Poliméricas

Conforme discutido anteriormente, o naproxeno não afetou de maneira significativa as reações de polimerização do MMA, ao contrário do que foi evidenciado para a azitromicina. Análises foram realizadas, então, de maneira a avaliar a influência do fármaco na distribuição de tamanhos das cadeias poliméricas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.26. Os valores das massas molares médias (Mn e Mw) e do índice de polidispersão são mostrados na Tabela 4.2.

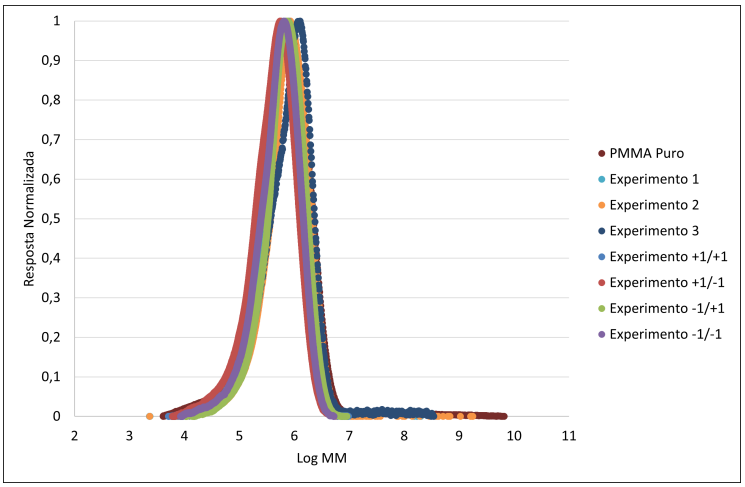


Figura 4.26: Distribuição de tamanhos das cadeias poliméricas das nanopartículas contendo naproxeno.

Tabela 4.2: Massas molares médias (Mn e Mw) e Índice de Polidispersão (PDI).

Experimento	Mn (Da)	Mw (Da)	Índice de Polidispersão
PMMA PURO	204.731	916117	4,47
Exp. 1	131.565	1.767.992	13,4
Exp. 2	221.791	911.535	4,1
Exp. 3	520.635	1.063.701	2,04
Exp. 4 (-1/+1)	345.978	784.621	2,3
Exp. 5 (+1/+1)	224.744	765.660	3,4
Exp. 6 (+1/-1)	162.472	504.587	3,1
Exp. 7 (-1/-1)	210.539	613.311	2,9

Ao analisar a Figura 4.26, nota-se, novamente, que o PMMA puro apresenta uma curva de distribuição de tamanhos de cadeia relativamente estreita. Os demais experimentos, conduzidos na presença de naproxeno, apresentaram distribuição de tamanhos de partícula muito similares entre si e semelhantes também à distribuição do PMMA puro. Dessa forma, percebe-se que o naproxeno, apesar de incorporado às nanopartículas de PMMA, parece não afetar de maneira relevante à reação de polimerização do MMA e à distribuição das cadeias poliméricas. No entanto, ao analisar os valores de massa molar média e os valores de PDI, nota-se que o aumento da concentração de naproxeno provoca uma leve queda nos valores das massas molares e no índice de polidispersão, o que pode indicar um efeito do naproxeno também como agente de transferência de cadeia. Ademais, para uma mesma concentração de fármaco, observa-se que o aumento na concentação de surfactante provoca um aumento nas massas molares, como esperado, uma vez que há o aumento na quantidade de nanogotas e, consequentemente, menor concentração de iniciador em cada

nanogota, resultando em um aumento da massa molar. Vale pontuar que os erros experimentais devem ser investigados de maneira uma detalhada, uma vez que variações foram observadas para os valores médios de Mn, Mw e PDI dos experimentos do ponto central.

Degradação Térmica

Como mencionado, os perfis de decomposição térmica também auxiliam na compreensão sobre a influência do naproxeno nas cadeias poliméricas de PMMA. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.27.

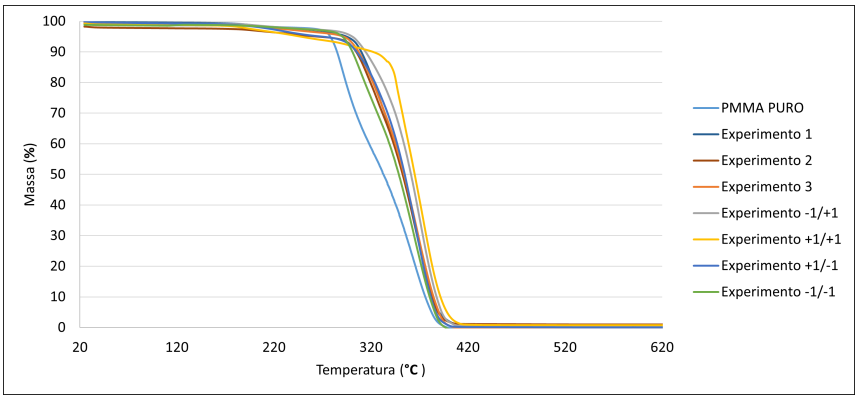


Figura 4.27: Análise termogravimétrica das nanopartículas produzidas na presença de naproxeno.

Diferentemente do comportamento evidenciado para a azitromicina, a termogravimetria mostra que as curvas de decomposição térmica das nanopartículas contendo naproxeno apresentam perfis muito semelhantes. No entanto, observa-se uma leve tedência de aumento da temperatura de degradação nas partículas contendo fármaco, possivelmente em função da presença deste composto disperso na matriz ou do leve aumento da massa molar das cadeias poliméricas. A ausência de diferentes degraus de degradação pode indicar a incorporação do naproxeno às matrizes poliméricas. Ressalta-se, então, a necessidade de uma análise mais detalhada para compreender o efeito do naproxeno na decomposição das cadeias de PMMA.

4.2.4 Eficiência de Encapsulamento do Naproxeno nas Nanopartículas de PMMA

De maneira semelhante ao que foi realizado para a azitromicina, foram analisados os espectros de RMN dos experimentos com naproxeno a fim de calcular a eficiências de encapsulamento. O sinal utilizado como referência para o naproxeno foi da metila A, destacada na Figura 4.28, sinal que não é sobreposto às bandas encontradas para

o PMMA, como já mostradado na Figura 4.28. É relevante pontuar que apenas os experimentos extremos do plano, (+1/+1) e (-1/-1), foram avaliados.

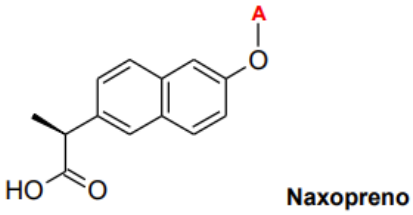
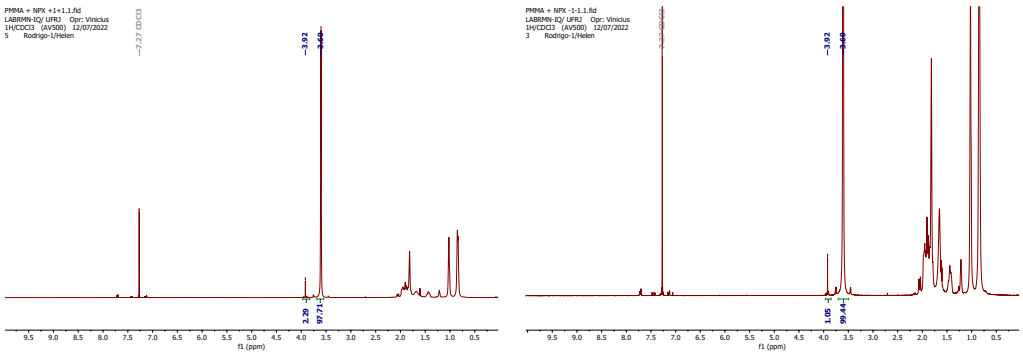


Figura 4.28: Metila A do naproxeno.

A metila A do naproxeno apresenta um sinal de 3,92 ppm. Os espectros obtidos para as análises realizadas são mostrados na Figura 4.29. Nos espectros das amostras avaliadas, a relação de PMMA e naproxeno foi de 2,29%, para o experimento (+1/+1), e de 1,05%, para o experimento (-1/-1).



(a) Espectro do experimento +1/+1. (b) Espectro do experimento -1/-1.

Figura 4.29: Espectros de RMN das amostras de naproxeno.

A partir dos resultados obtidos, foi possível calcular a eficiência de encapsulamento :76,3% para o exmeprimento (+1/+1) e aproximadamente 100% para o experimento (-1/-1). Vale ressaltar que há um erro percentual entre 4 e 6% relacionada ao método utilizada para o processo de integração das áreas nos espectros (Método de Riemann). É importante pontuar que o aumento no teor de naproxeno adicionado à reação resultou em uma diminuição da eficiência de encapsulamento. Dessa forma, aparentemente, mesmo a baixas concentrações de fármaco, a saturação das matrizes de PMMA pelo fármaco naproxeno foi atingida, diferentemente da azitromicina.

4.2.5 Ensaios de Liberação

O perfil de liberação do naproxeno das nanopartículas contendo o fármaco encapsulado também foi avaliado, seguindo metodologia semelhante à que foi discutida para a azitromicina. Para isso, foi conduzida uma análise no espectofotômetro de UV visível, sendo avaliada a amostra contendo maior concentração de fármaco (+1/+1). Vale pontuar que todos os dados relacionados ao ensaio de liberação do naproxeno são apresentados no Apêndice D. Assim, o perfil de liberação encontrado para o naproxeno pode ser observado na Figura 4.30.

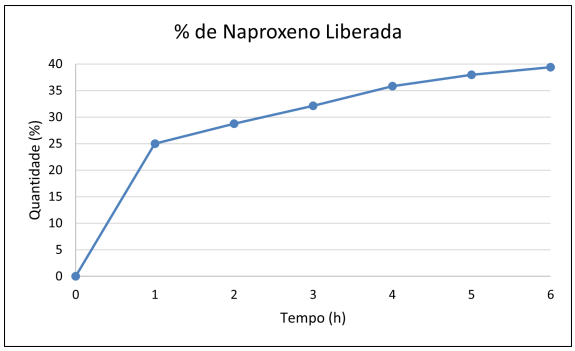


Figura 4.30: Perfil de liberação do naproxeno da matriz de PMMA ao longo das 6h

A partir da análise da Figura 4.30, é possível perceber que nas primeiras 4 horas de ensaio, a velocidade de liberação foi um pouco mais acentuada, ao comparar com as últimas 2 horas de teste, o que pode ser consequência da maior concentração de fármaco no meio, provocando uma diminuição na velocidade de difusão do naproxeno. Além disso, houve uma liberação de 40% de naproxeno ao longo de 6 horas. Esse valor corresponde à 19 μg de naproxeno liberado por 80 mg de nanopartículas. Para atingir a faixa de concentração terapêutica é acima de 50 μg, é necessário em torno de 210 g de nanopartículas [79]. Dessa forma, evidencia-se uma das vantagens do processo de encapsulamento: a liberação gradual do fármaco ao longo do tempo.

4.3 Comparação dos Fármacos

Nesta sessão, foi comparada a influência dos fármacos, azitromicina e naproxeno, na polimerização do MMA utilizando a mesma concentração de fármaco nas reações. Para efeito comparativo, também foram incluídos os resultados obtidos a partir da polimerização do MMA puro, sem fármaco. Nessa etapa, foi fixada a massa de fármaco em 400 mg e e a massa de surfactante em 120 mg. Na Figura 4.31 são apresentadas as cinéticas de polimerização do MMA na presença dos tais compostos.

Como já se sabe diante dos resultados mostrados anteriormente, a azitromicina retarda a cinética de polimerização, enquanto que o naproxeno parece não interferir

no processo reacional. A figura 4.31 mostra o desenvolvimento reacional de ambos os fármacos em relação ao tempo.

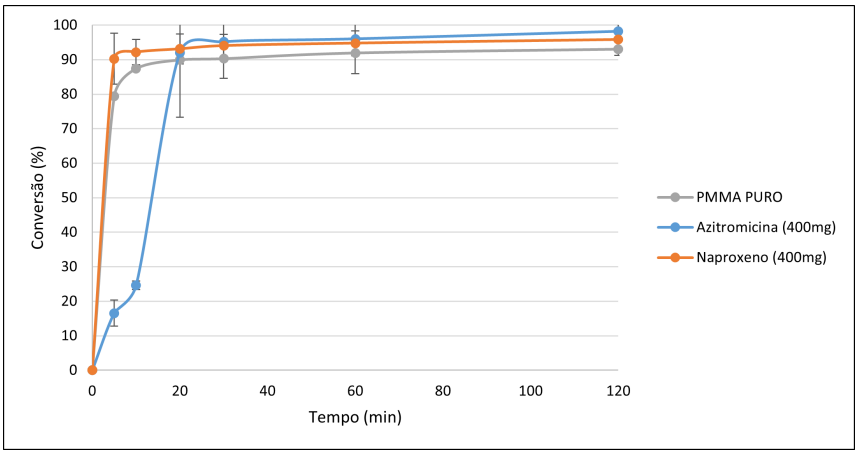


Figura 4.31: Comparação da cinética de polimerização do MMA na presença de azitromicina e naproxeno.

Nota-se que as curvas de polimerização do PMMA puro e na presença decom o naproxeno são bastante semelhantes e os dados de conversão obtidos são estatisticamente iguais. Evidencia-se também a diminuição da velocidade de reação provocada pela azitromicina. Contudo, mesmo na presença da azitromicina conversões elevadas são obtidas após 30min de reação.

Nota-se que as curvas de polimerização do PMMA puro e na presença de naproxeno são bastante semelhantes e os dados de conversão obtidos são estatisticamente iguais. Evidencia-se também a diminuição da velocidade de reação provocada pela azitromicina. Contudo, mesmo na presença da azitromicina conversões elevadas são obtidas após 30min de reação.

Os resultados de ditribuição de tamanhos de partículas são apresentados na Figura 4.32. Em relação à distribuição de tamanho de partícula, os resultados obtidos podem ser observados na Figura 4.31. Observa-se que a distribuição de tamanhos de partícula dos materiais contendo naproxeno é muito similar à curva do PMMA puro, como notado anteriormente. A azitromicina, novamente, provoca um deslocamento das curvas de distribuição de tamanhos para diâmetros maiores. Além disso, o fármaco provoca um alargamento das curvas de distribuição de tamanhos. Tal resultado reforça o efeito mais significativo da azitromicina na cinética de polimerização e na estabilidade da emulsão, diminuindo a velocidade de reação e provocando um aumento da taxa de aglomeração das nanopartículas poliméricas.

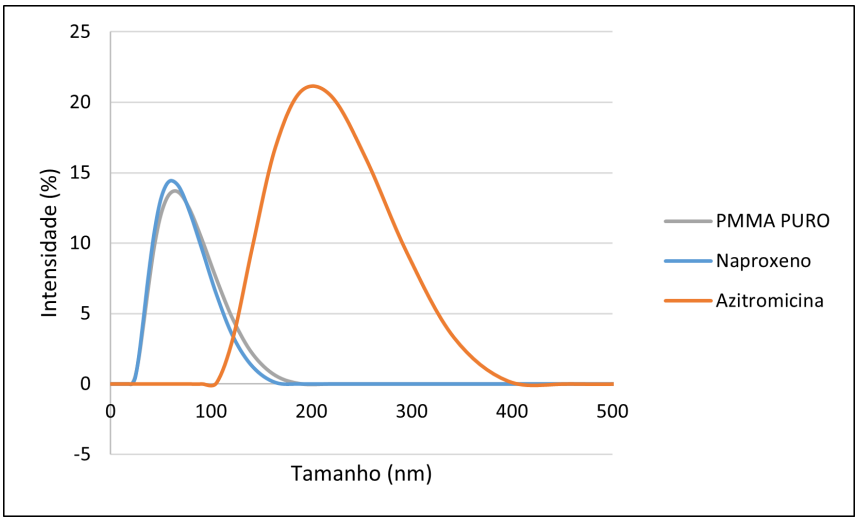


Figura 4.32: Comparação das distribuições de tamanhos de partícula dos materiais contendo azitromicina e naproxeno.

Na Figura 4.33 são apresentados os diâmetros médios de partícula dos materiais poliméricos produzidos. Novamente, observa-se que a polimerização na presença de naproxeno resulta em partículas com tamanho médio similar ao da reação sem fármaco, ao longo de toda reação. Tal resultado indica que, para as condições reacionais avaliadas, a definição do diâmetro característico das nanopartículas ocorre nos 5 minutos iniciais da reação. Em contrapartida, a reação na presença de azitromicina resultou em partículas com diâmetro médio significativamente superior, quando comparada às anteriores. Além disso, na presença da azitromicina, o diâmetro médio característicos das nanopartículas poliméricas é definido após 20min de reação.

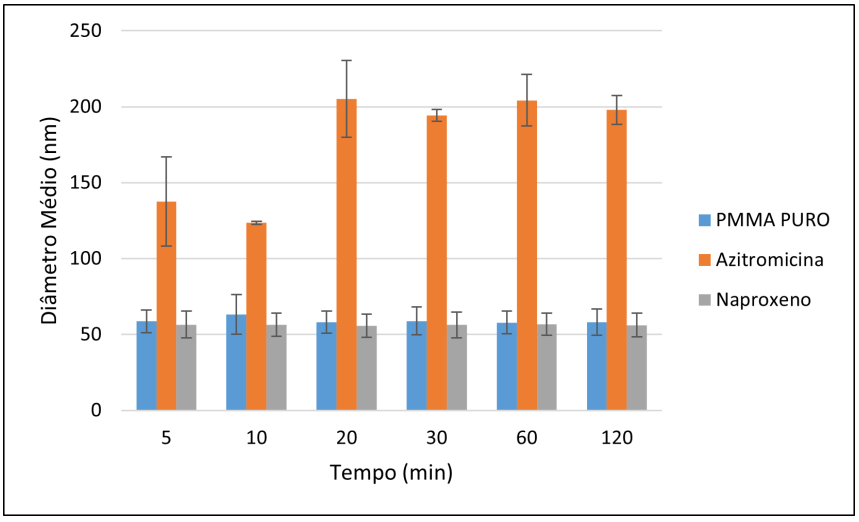


Figura 4.33: Comparação dos diâmetros médios de partícula dos materiais contendo azitromicina e naproxeno.

4.4 Considerações Finais

Por tudo que foi apresentado, é possível perceber que nanopartículas poliméricas contendo os fármacos naproxeno e azitromicina foram produzidas com êxito. Além disso, percebe-se a influência de ambos os fármacos na cinética de polimerização do MMA e também na morfologia das nanopartículas produzidas. O efeito da azitromicina nas proprieades morfológicas das partículas é mais significativo que o do naproxeno. Ao avaliar a estrutura química de ambos os fármacos, percebe-se que o maior número de grupamentos funcionais presentes na azitromicina possivelmente justifica a influência mais significativa nas propriedades dos nanomateriais produzidos. Contudo, com base nos resultados obtidos, não é possível afirmar se tais fármacos são majoritariamente incorporados às cadeias dos polímeros ou permanecem dispersos na matriz polimérica.

Capítulo 5

Conclusão e Sugestões

Por tudo que foi apresentado, foi possível observar que foram produzidas com êxito nanopartículas contendo os fármacos azitromicina e naproxeno encapsulados. As diferentes condições reacionais resultaram em partículas em escala nanométrica, diâmetros indicados para aplicações na área farmacêutica. Como mencionado, os fármacos estudados podem ser empregadas para auxílio ao combate dos sintomas do COVID-19 e de infecções oportunistas.

Pôde-se notar que a azitromicina provocou redução na velocidade de reação de polimerização do metacrilato de metila. Tal redução possivelmente provocou um aumento na taxa de coalescência das partículas, resultando em um aumento do diâmetro médio das partículas produzidas, ao comparar com as partículas puras de PMMA. Ao avaliar a massa molar das cadeias poliméricas, o aumento de azitromicina provocou um deslocamento das curvas de distribuição de massa molar para tamanhos menores, indicando agir como um possível agente de transferência de cadeia. Para aplicações na área farmacêutica, a condição experimental na qual menor teor de azitromicina e maior teor de surfactante foram adicionados ao meio reacional (-1/+1) foi a mais promissora, uma vez que foram obtidas curvas de distribuição de tamanho mais estreita, com diâmetro médio próximo a 150 nm.

Percebeu-se que a adição de naproxeno não interferiu de maneira significativa na cinética da reação e no diâmetro de partícula. Dessa maneira, as diferentes condições experimentais avaliadas resultaram em partículas com tamanhos e índices de polidispersão indicados para aplicações em área farmacêutica.

Além disso, foi possível determinar a eficiência de encapsulamento de alguns experimentos (+1/+1 e -1/-1) para ambos os fármacos. Em relação à azitromicina, a condição experimental associada à adição de maior teor de azitromicina e de surfactante (+1/+1) apresentou uma eficiência de encapsulamento de aproximadamente 33,5%. A condição experimental associada à adição de menor teor de azitromicina e de surfactante (-1/-1) apresentou uma eficiência de encapsulamento de aproximadamente 12%. Para o naproxeno, a condição experimental associada à adição de maior

teor de naproxeno e de surfactante (+1/+1) apresentou uma eficiência de encapsulamento de aproximadamente 76,5%. A condição experimental associada à adição de menor teor de naproxeno e de surfactante (-1/-1) apresentou uma eficiência de encapsulamento de aproximadamente 100%. Ressalta-se, então, a necessidade de um estudo mais aprofundado de maneira a avaliar a concentração limi te de fármaco para ser incorporado às particulas poliméricas.

Foi possível notar ainda, quantitativamente, que houve a liberação da azitromicina das nanopartículas de PMMA ao longo do tempo. Para o naproxeno, a liberação foi de aproximadamente 40% do fármaco após 6h. Dessa maneira, evidencia-se um dos benefícios em utilizar fármacos encapsulados: sua liberação gradual no organismo ao longo do tempo. Nota-se, assim, a relevância tecnológica, científica e de saúde pública do tema e o grande potencial de aplicação dos nanosistemas produzidos.

5.1 Sugestões

- Para trabalhos futuros, sugere-se a investigação do encapsulamento de novas concentrações dos fármacos, principalmente do fármaco naproxeno, uma vez que concentrações baixar foram exploradas nesse estudo inicial. Além disso, realizar um novo ensaio de encapsulamento de azitromicina em pH controlado entre 9,5, para verificar se os efeitos da ionização da molécula interferiram na reação de polimerização. Há necessidade de conduzir um estudo aprofundado para investigar o teor de saturação das partículas por cada um dos fármacos.

- Os ensaios de liberação dos fármacos foram conduzidos, no presente trabalho, seguindo umaa metodologia padrão já definida para outro fármaco na Farmacopeia. Contudo, há necessidade de quantificar tal liberação em condições similares àquelas nas quais os fármacos serão empregados.

- Novas análises de caracterização deverão ser investigadas de maneira a avaliar de forma mais precisa a liberação quantitativa da azitromicina. Por meio da meto- dologia adotada no presente estudo não foi possível quantificar de maneira precisa o teor de azitromicina liberado ao longo do tempo.

- Além disso, devem ser estudados fármacos que atualmente venham apresentando êxito no combate direto ao vírus SARS-CoV2.

Referências Bibliográficas

[1] GADDE, S. "Multi-drug delivery nanocarriers for combination therapy", *MedChemComm*, v. 6, n. 11, pp. 1916–1929, 2015.

[2] MIRANDA, A. A. D. A. "Aplicações da nanotecnologia em doenças do foro neurológico: vantagens e desafios", 2014.

[3] ASSOCIATION, A. A. P., OTHERS. "National center for biotechnology information. pubchem compound summary for CID 12699, N-Nitroso-N-methylurea. retrieved 24". 2020.

[4] ASSOCIATION, A. A. P., OTHERS. "National center for biotechnology information. pubchem compound summary for CID 12699, N-Nitroso-N-methylurea. retrieved 24". 2020.

[5] KALE, S. N., DEORE, S. L. "Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review", *Systematic Reviews in Pharmacy*, v. 8, n. 1, pp. 39, 2017.

[6] FE, L. X. S. G. M., CIPOLATTI, E. P., PINTO, M. C. C., et al. "Enzymes in the time of COVID-19: An overview about the effects in the human body, enzyme market, and perspectives for new drugs", *Medicinal Research Reviews*, v. 42, n. 6, pp. 2126–2167, 2022.

[7] WORLD HEALTH ORGANISATION. "WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard". 2021. `https://covid19.who.int/`, Last accessed on 12-04-2022.

[8] JAQUELINE SILVA. "Organização Pan-Americana da Saúde". Disponível em: ://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2023-oms-declara-fim-da-emergencia-saude-publica-importancia-internacional-referente.

[9] AL-QAHTANI, A. A. "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Emergence, history, basic and clinical aspects", *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 27, n. 10, pp. 2531–2538, 2020. ISSN: 1319-562X. doi: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.033. Disponível em: <`https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20301558`>.

[10] SIMONAZZI, A., CID, A. G., VILLEGAS, M., et al. "Nanotechnology applications in drug controlled release". In: *Drug targeting and stimuli sensitive drug delivery systems*, Elsevier, pp. 81–116, 2018.

[11] FRESTA, M., PUGLISI, G., GIAMMONA, G., et al. "Pefloxacine mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation", *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 84, n. 7, pp. 895–902, 1995.

[12] TORCHILIN, V. P. *Nanoparticulates as drug carriers*. Imperial college press, 2006.

[13] SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. D. L., et al. "Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos", *Química nova*, v. 26, pp. 726–737, 2003.

[14] CASTOR JR, C. A., AZEVEDO, G., SANTOS JR, J., et al. "PMMA-based biomedical applications: manufacture and uses", *Advances in Medicine and Biology; Nova Medicine & Health: New York, NY, USA*, v. 141, pp. 97–167, 2019.

[15] ABD EL-AZIZ, T. M., STOCKAND, J. D. "Recent progress and challenges in drug development against COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2)-an update on the status", *Infection, Genetics and Evolution*, v. 83, pp. 104327, 2020.

[16] ABANI, O., ABBAS, A., ABBAS, F., et al. "Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial", *The Lancet*, v. 397, n. 10285, pp. 1637–1645, 2021.

[17] EL-BENDARY, M., ABD-ELSALAM, S., ELBAZ, T., et al. "RETRACTED ARTICLE: Efficacy of combined Sofosbuvir and Daclatasvir in the treatment of COVID-19 patients with pneumonia: A multicenter Egyptian study", *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 20, n. 2, pp. 291–295, 2022.

[18] FINTELMAN-RODRIGUES, N., SACRAMENTO, C. Q., RIBEIRO LIMA, C., et al. "Atazanavir, alone or in combination with ritonavir, inhibits SARS-CoV-2 replication and proinflammatory cytokine production", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 64, n. 10, pp. 10–1128, 2020.

[19] PETERS, D. H., FRIEDEL, H. A., MCTAVISH, D. "Azithromycin", *Drugs*, v. 44, n. 5, pp. 750–799, 1992.

[20] TODD, P. A., CLISSOLD, S. P. "Naproxen", *Drugs*, v. 40, n. 1, pp. 91–137, 1990.

[21] GAO, J., TIAN, Z., YANG, X. "Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies", *Bioscience trends*, v. 14, n. 1, pp. 72–73, 2020.

[22] JUURLINK, D. N. "Safety considerations with chloroquine, hydroxychloroquine and azithromycin in the management of SARS-CoV-2 infection", *Cmaj*, v. 192, n. 17, pp. E450–E453, 2020.

[23] CHAMUNDEESWARI, M., JESLIN, J., VERMA, M. L. "Nanocarriers for drug delivery applications", *Environmental Chemistry Letters*, v. 17, n. 2, pp. 849–865, 2019.

[24] ELSABAHY, M., WOOLEY, K. L. "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications", *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, pp. 2545–2561, 2012.

[25] AKBARZADEH, A., REZAEI-SADABADY, R., DAVARAN, S., et al. "Liposome: classification, preparation, and applications", *Nanoscale research letters*, v. 8, pp. 1–9, 2013.

[26] GILLIES, E. R., FRECHET, J. M. "Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery", *Drug discovery today*, v. 10, n. 1, pp. 35–43, 2005.

[27] VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles", *Pharmaceutical research*, v. 26, n. 5, pp. 1025–1058, 2009.

[28] ŁUKASIEWICZ, S., SZCZEPANOWICZ, K., BŁASIAK, E., et al. "Biocompatible polymeric nanoparticles as promising candidates for drug delivery", *Langmuir*, v. 31, n. 23, pp. 6415–6425, 2015.

[29] DES RIEUX, A., FIEVEZ, V., GARINOT, M., et al. "Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach", *Journal of controlled release*, v. 116, n. 1, pp. 1–27, 2006.

[30] FRAZER, R. Q., BYRON, R. T., OSBORNE, P. B., et al. "PMMA: an essential material in medicine and dentistry", *Journal of long-term effects of medical implants*, v. 15, n. 6, 2005.

[31] CALZONI, E., CESARETTI, A., POLCHI, A., et al. "Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies", *Journal of functional biomaterials*, v. 10, n. 1, pp. 4, 2019.

[32] ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L. K., et al. "Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles", *Molecular pharmaceutics*, v. 5, n. 4, pp. 505–515, 2008.

[33] MOHANRAJ, V., CHEN, Y. "Nanoparticles-a review", *Tropical journal of pharmaceutical research*, v. 5, n. 1, pp. 561–573, 2006.

[34] ODIAN, G. *Principles of polymerization*. John Wiley & Sons, 2004.

[35] ARSHADY, R. "Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey", *Colloid and polymer science*, v. 270, pp. 717–732, 1992.

[36] LOVELL, P. A., SCHORK, F. J. "Fundamentals of emulsion polymerization", *Biomacromolecules*, v. 21, n. 11, pp. 4396–4441, 2020.

[37] CHERN, C. "Emulsion polymerization mechanisms and kinetics", *Progress in polymer science*, v. 31, n. 5, pp. 443–486, 2006.

[38] ASUA, J. M. "Miniemulsion polymerization", *Progress in polymer science*, v. 27, n. 7, pp. 1283–1346, 2002.

[39] TOMOVSKA, R., DE LA CAL, J. C., ASUA, J. M. "Reactions in heterogeneous media: emulsion, miniemulsion, microemulsion, suspension, and dispersion polymerization", *Monitoring Polymerization Reactions: From Fundamentals to Applications*, pp. 59–77, 2013.

[40] LAU, W. "Emulsion polymerization of hydrophobia monomers". In: *Macromolecular Symposia*, v. 182, pp. 283–289. Wiley Online Library, 2002.

[41] CHERN, C.-S. *Principles and applications of emulsion polymerization*. John Wiley & Sons, 2008.

[42] REMPEL, G. L., WANG, H. "Microemulsion Polymerization". In: Kobayashi, S., Müllen, K. (Eds.), *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, pp. 1241–1250, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2015. ISBN: 978-3-642-29648-2. doi: 10.1007/978-3-642-29648-2_262. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29648-2_262>.

[43] VENDEIRA, M. "Valente", .

[44] ASUA, J. M. "Challenges for industrialization of miniemulsion polymerization", *Progress in Polymer Science*, v. 39, n. 10, pp. 1797–1826, 2014.

[45] CRESPY, D., LANDFESTER, K. "Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers", *Beilstein journal of organic chemistry*, v. 6, n. 1, pp. 1132–1148, 2010.

[46] UHRICH, K. E., CANNIZZARO, S. M., LANGER, R. S., et al. "Polymeric systems for controlled drug release", *Chemical reviews*, v. 99, n. 11, pp. 3181–3198, 1999.

[47] DANDEKAR, P., VENKATARAMAN, C., MEHRA, A. "Pulmonary targeting of nanoparticle drug matrices", *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, v. 23, n. 6, pp. 343–353, 2010.

[48] KU, T., GILL, S., LÖBENBERG, R., et al. "Size dependent interactions of nanoparticles with lung surfactant model systems and the significant impact on surface potential", *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 8, n. 6, pp. 2971–2978, 2008.

[49] WU, L., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C., CUN, D., et al. "Quantitative comparison of three widely-used pulmonary administration methods in vivo with radiolabeled inhalable nanoparticles", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 152, pp. 108–115, 2020.

[50] BALLOW, C. H., AMSDEN, G. W. "Azithromycin: the first azalide antibiotic", *Annals of pharmacotherapy*, v. 26, n. 10, pp. 1253–1261, 1992.

[51] BAKHEIT, A. H., AL-HADIYA, B. M., ABD-ELGALIL, A. A. "Azithromycin", *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, v. 39, pp. 1–40, 2014.

[52] YASOJIMA, M., NAKADA, N., KOMORI, K., et al. "Occurrence of levofloxacin, clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan", *Water science and technology*, v. 53, n. 11, pp. 227–233, 2006.

[53] DERENDORF, H. "Excessive lysosomal ion-trapping of hydroxychloroquine and azithromycin", *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, n. 6, pp. 106007, 2020.

[54] KATZUNG, B. G., TREVOR, A. J. *Farmacologia Básica e Clínica-13*. McGraw Hill Brasil, 2017.

[55] LANGTRY, H. D., BALFOUR, J. A. "Azithromycin", *Drugs*, v. 56, n. 2, pp. 273–297, 1998.

[56] LUKE, D. R., FOULDS, G. "Disposition of oral azithromycin in humans", *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 61, n. 6, pp. 641–648, 1997.

[57] TOTI, U. S., GURU, B. R., HALI, M., et al. "Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles", *Biomaterials*, v. 32, n. 27, pp. 6606–6613, 2011.

[58] ZHANG, C., DONG, Y., ZHAO, L. "Preparation and characterization of novel microparticles based on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate)", *Journal of Microencapsulation*, v. 31, n. 1, pp. 9–15, 2014.

[59] YASSIN, A. E., ALBEKAIRY, A. M., OMER, M. E., et al. "Chitosan-coated azithromycin/ciprofloxacin-loaded polycaprolactone nanoparticles: a characterization and potency study", *Nanotechnology, Science and Applications*, pp. 59–72, 2023.

[60] YUNIARTI, N., YULIZAR, Y. "Chitosan Nanoparticles Modified by Anredera cordifolia (Ten.) Steenis Leaf Extract for Enhancement of Azithromycin Encapsulation Efficiency and Loading Capacity: In vitro Drug Release Study", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, n. 12, pp. 3164–3174, 2023.

[61] HARRINGTON, P. J., LODEWIJK, E. "Twenty years of naproxen technology", *Organic Process Research & Development*, v. 1, n. 1, pp. 72–76, 1997.

[62] ASADI, M., SAYAR, S., RADMANESH, E., et al. "Efficacy of naproxen in the management of patients hospitalized with COVID-19 infection: A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial", *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 15, n. 6, pp. 102319, 2021.

[63] HENRY, D. "Side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs", *Bailliere's clinical rheumatology*, v. 2, n. 2, pp. 425–454, 1988.

[64] WHELTON, A., WATSON, A. J. "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: effects on kidney function", *Clinical Nephrotoxins*, pp. 203–216, 1998.

[65] KENCHAIAH, S., NARULA, J., VASAN, R. S. "Risk factors for heart failure", *Medical Clinics*, v. 88, n. 5, pp. 1145–1172, 2004.

[66] KIM, J.-H., PAXTON, T. E., TOMASKO, D. L. "Microencapsulation of naproxen using rapid expansion of supercritical solutions", *Biotechnology Progress*, v. 12, n. 5, pp. 650–661, 1996.

[67] WANG, B., JIANG, W., YAN, H., et al. "Novel PEG-graft-PLA nanoparticles with the potential for encapsulation and controlled release of hydrophobic and hydrophilic medications in aqueous medium", *International Journal of Nanomedicine*, pp. 1443–1451, 2011.

[68] THAMMAWONG, C., SREEARUNOTHAI, P., PETCHSUK, A., et al. "Preparation and characterizations of naproxen-loaded magnetic nanoparticles coated with PLA-g-chitosan copolymer", *Journal of Nanoparticle Research*, v. 14, pp. 1–12, 2012.

[69] ČALIJA, B., CEKIĆ, N., SAVIĆ, S., et al. "An investigation of formulation factors affecting feasibility of alginate-chitosan microparticles for oral delivery of naproxen", *Archives of pharmacal research*, v. 34, pp. 919–929, 2011.

[70] RAO, Y. S., PV, K. K. "BIODEGRADABLE NANOSPHERES-CURRENT STATUS." *Indian Drugs*, v. 57, n. 5, 2020.

[71] PINTO, J. C., SCHWAAB, M. *Análise de Dados Experimentais v. II: Planejamento de Experimentos*. Editora E-papers, 2011.

[72] MCCOOL, B., MURPHY, L., TRIPP, C. P. "A simple FTIR technique for estimating the surface area of silica powders and films", *Journal of colloid and interface science*, v. 295, n. 1, pp. 294–298, 2006.

[73] MLYNÁRIK, V. "Introduction to nuclear magnetic resonance", *Analytical Biochemistry*, v. 529, pp. 4–9, 2017.

[74] ANDO, I., KUROKI, S., KUROSU, H., et al. "NMR chemical shift calculations and structural characterizations of polymers", *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 39, n. 2, pp. 79–133, 2001.

[75] LESOT, P., COURTIEU, J. "Natural abundance deuterium NMR spectroscopy: Developments and analytical applications in liquids, liquid crystals and solid phases", *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 55, n. 2, pp. 128–159, 2009.

[76] CHAKRAPANI, S. B., MINKLER, M. J., BECKINGHAM, B. S. "Low-field 1 H-NMR spectroscopy for compositional analysis of multicomponent polymer systems", *Analyst*, v. 144, n. 5, pp. 1679–1686, 2019.

[77] MALKOCH, M., MALMSTRÖM JONSSON, E., NYSTRÖM, A. "Dendrimers: properties and applications", 2012.

[78] STRIEGEL, A. M., YAU, W. W., KIRKLAND, J. J., et al. *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., 2009.

[79] DAY, R. O., FURST, D. E., DROMGOOLE, S. H., et al. "Relationship of serum naproxen concentration to efficacy in rheumatoid arthritis", *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 31, n. 6, pp. 733–740, 1982.

Anexo A

A Tabela 1 apresenta os valores de conversão do MMA nos experimentos do ponto central da azitromicina.

Tabela 1: Conversões dos Experimentos Centrais.

Tempo (min)	Conversão (%)			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média
0	0	0	0	0
5	6,07	8,31	9,84	8,07
10	17,11	15,91	16,55	16,52
20	27,69	45,97	33,27	35,64
30	84,59	82,83	92,79	86,74
60	87,21	86,12	95,37	89,57
120	72,65	74,27	78,00	74,97

A Tabela 2 apresenta os valores de conversão do MMA nos experimentos do plano experimental da azitromicina. Na Tabela 3 é apresenta os dados cinéticos da polimerização do MMA puro, sem azitromicina.

Tabela 2: Conversões dos Experimentos do Plano da Azitromicina.

Tempo (min)	Conversão (%)			
	Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6	Experimento 7
0	0	0	0	0
5	15,19 ± 3,79	5,51 ± 3,79	9,66 ± 3,79	8,83 ± 3,79
10	24,63 ± 1,20	10,52 ± 1,20	13,95 ± 1,20	11,13 ± 1,20
20	91,73 ± 18,74	40,10 ± 18,74	18,34 ± 18,74	19,69 ± 18,74
30	94,30 ± 10,62	40,92 ± 10,62	33,76 ± 10,62	40,37 ± 10,62
60	95,38 ± 10,11	42,09 ± 10,11	-	71,59 ± 10,11
120	98,18 ± 5,49	53,06 ± 5,49	-	98,37 ± 5,49

Tabela 3: Conversão do PMMA puro.

Tempo (min)	Conversão (%)
0	0
5	79,34
10	87,39
20	89,84
30	90,29
60	91,93
120	93,03

A Tabela A.4 apresenta os valores de conversão do MMA nos experimentos do ponto central do naproxeno.

Tabela 4: Conversões dos Experimentos Centrais.

Tempo (min)	Conversão (%)			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média
0	0	0	0	0
5	85,51	87,42	92,63	88,52
10	93,29	90,91	94,54	92,91
20	97,36	93,06	95,68	95,37
30	97,36	94,48	97,23	96,36
60	98,39	94,85	97,13	96,79
120	99,78	95,43	98,63	97,95

A Tabela A.5 apresenta os valores de conversão do MMA nos experimentos do plano experimental do naproxeno.

Tabela 5: Conversões dos Experimentos do Plano do Naproxeno.

Tempo (min)	Conversão (%)			
	Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6	Experimento 7
0	0	0	0	0
5	89,60 ± 7,37	30,78 ± 7,37	33,26 ± 7,37	28,91 ± 7,37
10	91,47 ± 3,69	-	85,63 ± 3,69	84,97 ± 3,69
20	93,36 ± 4,34	78,56 ± 4,34	86,91 ± 4,34	89,12 ± 4,34
30	94,85 ± 3,26	85,54 ± 3,26	88,65 ± 3,26	89,76 ± 3,26
60	95,34 ± 3,59	92,51 ± 3,59	89,04 ± 3,59	90,70 ± 3,59
120	96,07 ± 4,51	97,58 ± 4,51	89,20 ± 4,51	91,59 ± 4,51

Anexo B

Nas Tabelas 6 e 7 são apresentados os valores de diâmetro médio e a média dos diâmetros médios dos experimentos do ponto central e do plano experimental da azitromicina, respectivamente. Já nas Tabelas 8 e 9 são apresentados os valores de diâmetro médio e a média dos experimentos do ponto central e do plano experimental do naproxeno, respectivamente.

Tabela 6: Diâmetro Médio e Média dos Experimentos Centrais.

Tempo (min)	Experimento (nm)			Média
	1	2	3	
5	163,6	169,2	107,3	146,7
10	150,0	135,3	143,5	142,9
20	197,5	287,5	188,8	224,6
30	297,6	236,4	273,6	269,2
60	419,2	242,7	296,8	319,6
120	714,9	2502	1853	1690,0

Tabela 7: Diâmetro Médio dos Experimentos do Plano da Azitromicina.

Tempo (min)	Experimento (nm)			
	4	5	6	7
5	137,5 ± 68,5	111,8 ± 68,5	374,2 ± 68,5	114,7 ± 68,5
10	123,6 ± 14,7	164,1 ± 14,7	389,8 ± 14,7	154,5 ± 14,7
20	205,2 ± 109,3	288,3 ± 109,3	696,3 ± 109,3	218,0 ± 109,3
30	194,3 ± 61,7	270,0 ± 61,7	696,1 ± 61,7	313,9 ± 61,7
60	204,2 ± 180,9	2464 ± 180,9	657,5 ± 180,9	833,5 ± 180,9
120	198,0 ± 1809,3	3872 ± 1809,3	-	2351 ± 1809,3

Tabela 8: Diâmetro Médio e Média dos Experimentos Centrais.

Tempo (min)	Experimento (nm)			Média
	1	2	3	
5	68,81	68,55	66,87	68,10
10	43,81	66,34	66,45	66,40
20	69,41	67,84	66,95	68,10
30	456,9	65,93	66,90	66,40
60	71,89	66,30	66,31	68,20
120	67,39	66,58	66,77	66,90

Tabela 9: Diâmetro Médio dos Experimentos do Plano do Naproxeno.

Tempo (min)	Experimento (nm)			
	4	5	6	7
5	54,95 ± 2,1	3095 ± 2,1	57,18 ± 2,1	108,5 ± 2,1
10	55,27 ± 0,2	120,2 ± 0,2	55,6 ± 0,2	123,4 ± 0,2
20	54,93 ± 2,5	124,2 ± 2,5	55,74 ± 2,5	124 ± 2,5
30	54,99 ± 1,4	123,7 ± 1,4	55,61 ± 1,4	126,4 ± 1,4
60	54,48 ± 6,4	122,4 ± 6,4	73,81 ± 6,4	126,8 ± 6,4
120	55,1 ± 0,8	122,9 ± 0,8	56,21 ± 0,8	125,2 ± 0,8

Anexo C

Os espectros de FTIR de cada um dos materiais produzidos ao longo do presente trabalho na presença de azitromicina são apresentados a seguir nas Figuras 1 e 2.

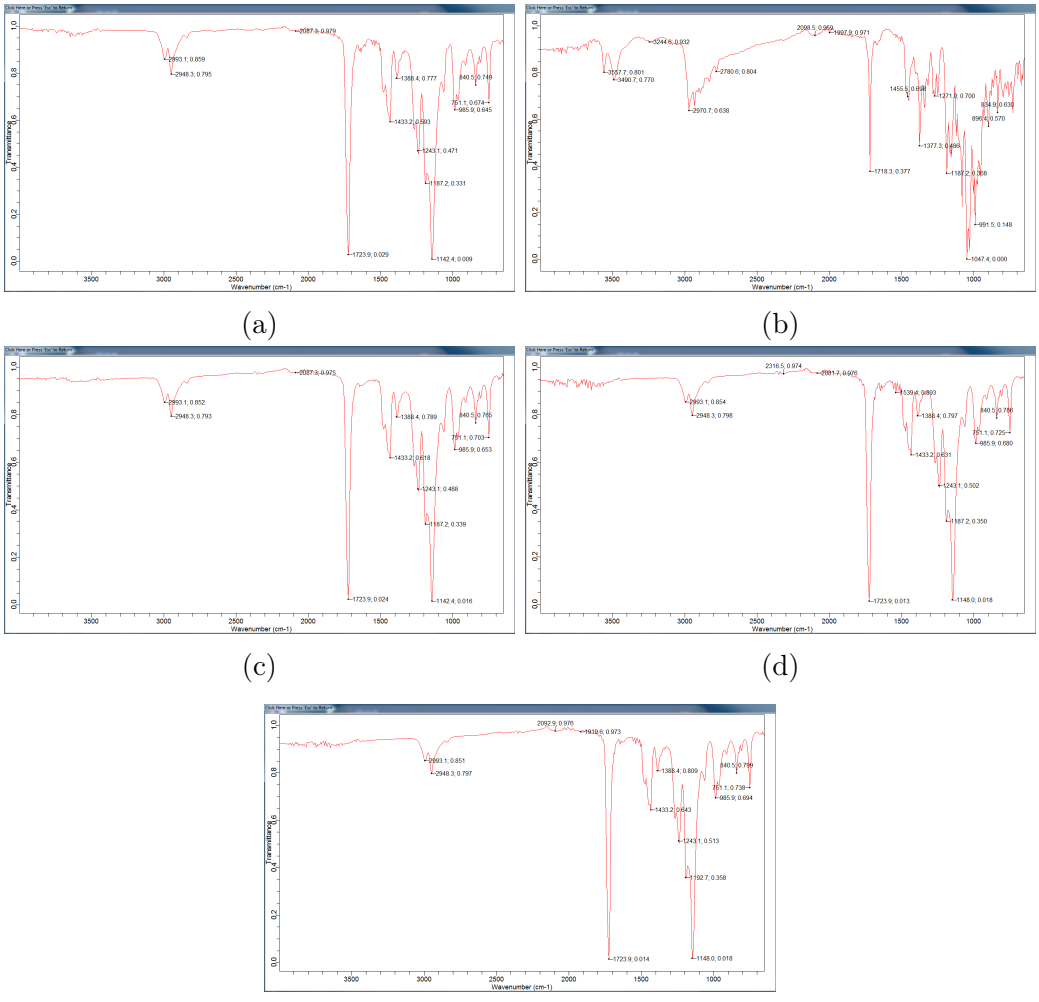
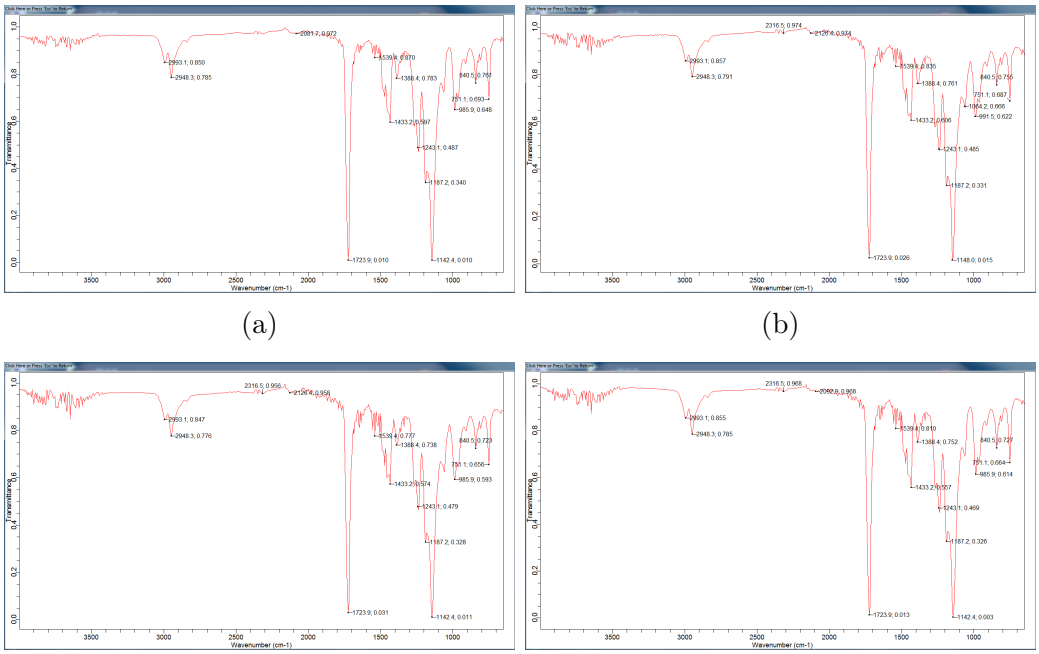


Figura 1: Espectros de FTIR dos materiais produzidos:(a) Espectro do PMMA, (b) Espectro da Azitromicina, (c) Espectro do Experimento 1, (d) Espectro do Experimento 2, (e) Espectro do Experimento 3

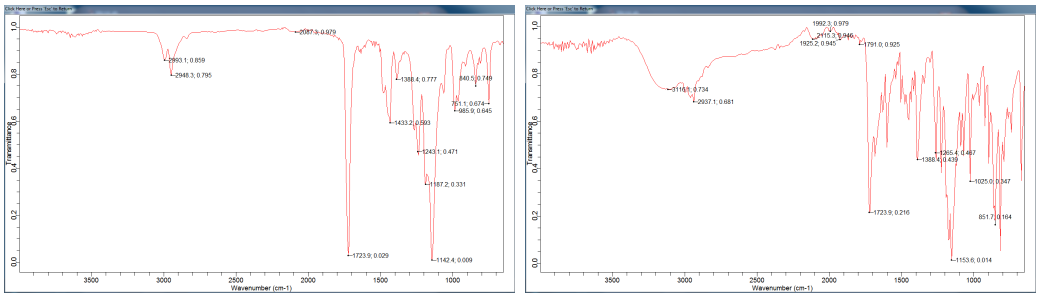


(a) (b)

(c) (d)

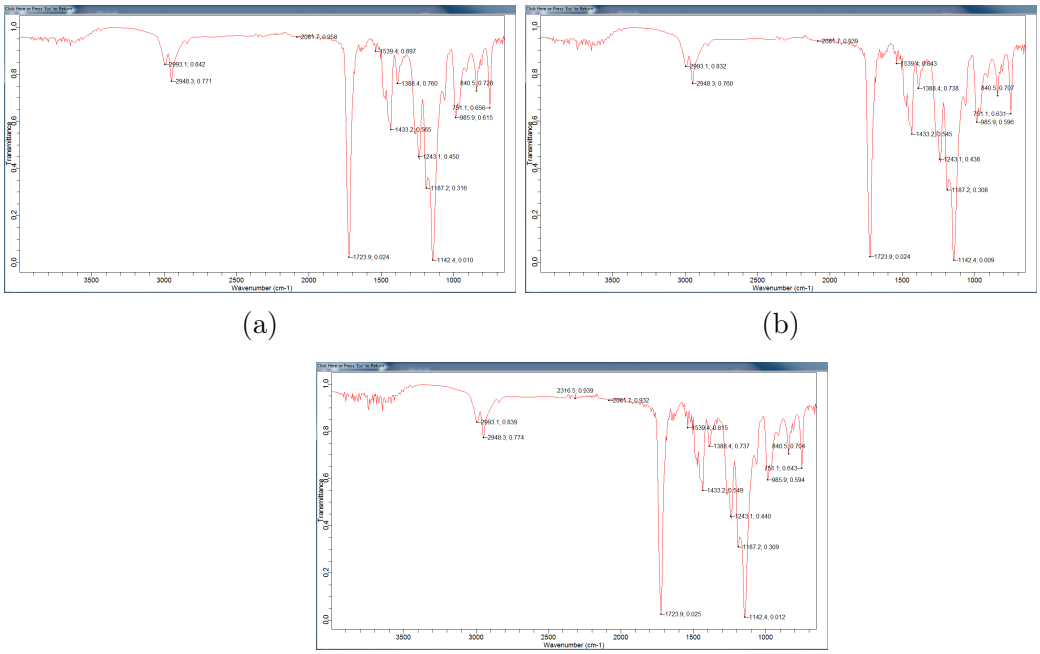
Figura 2: Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Experimento 4, (b) Experimento 5, (c) Experimento 6, (d) Experimento 7.

Os espectros de FTIR de cada um dos materiais produzidos ao longo do presente trabalho na presença de naproxeno são apresentados a seguir nas Figuras 3, 4 e 5.



(a) (b)

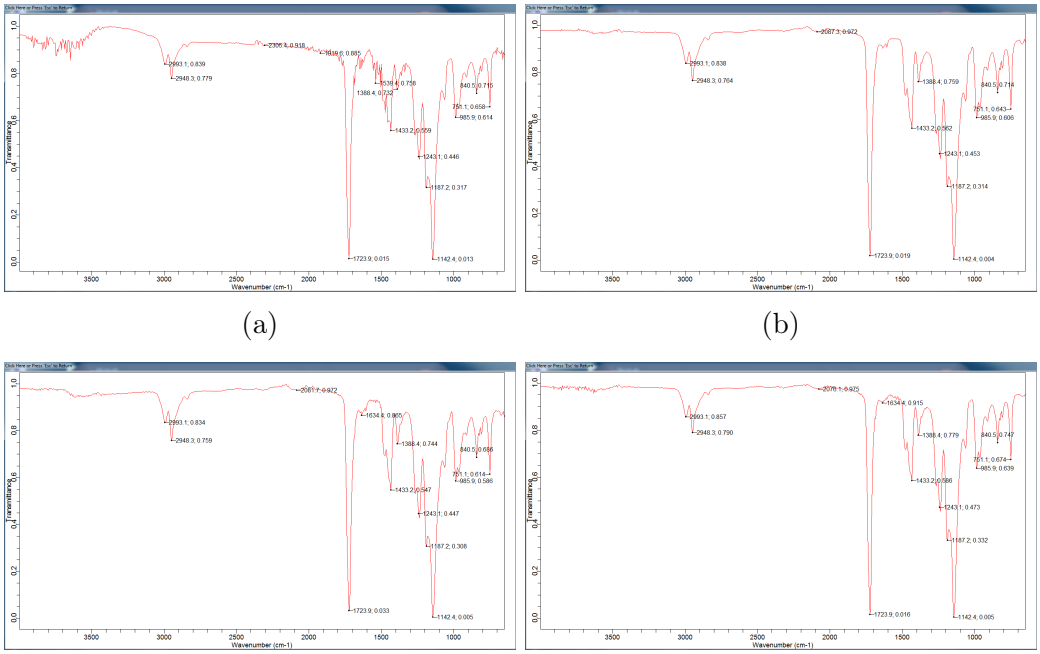
Figura 3: Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Espectro do PMMA, (b) Espectro do Naproxeno.



(a) (b)

(c)

Figura 4: Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Experimento 1, (b) Experimento 2 e (c) Experimento 3.



(a) (b)

(c) (d)

Figura 5: Espectros de FTIR dos materiais produzidos: (a) Experimento 4, (b) Experimento 5, (c) Experimento 6 e (d) Experimento 7.

Anexo D

Os ensaios de liberação dos fármacos azitromicina e naproxeno foram conduzidos no dissolutor mostrado na Figura 6.

Figura 6: Dissolutor usado nos ensaios de liberação dos fármacos.

Azitromicina

Buscou-se avaliar o perfil de liberação da azitromicina a partir das amostras de nanopartícula. No entanto, não foi possível conduzir uma análise qualitativa em função das restrições identificadas para a análise UV-vis, disponível para condução de tal caracterização. O espectofotômetro de UV visível que foi utilizado para análise possui intervalo de medição de comprimento de onda entre 200 e 300 nm, e o comprimento de onda máximo da azitromicina é inferior aos 200 nm na leitura do equipamento, o que torna limita uma análise precisa de tais amostras. A Figura 7 apresenta as faixas de absorção da azitromicina no UV em diferentes concentrações do fármaco.

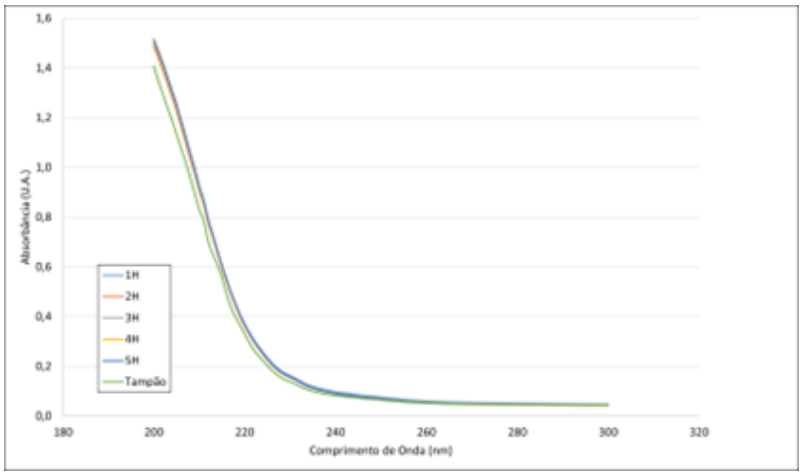


Figura 8: Perfis de liberação ao longo do tempo de experimento.

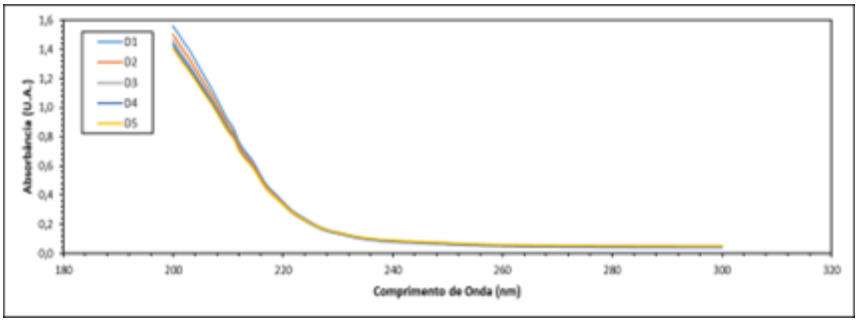


Figura 7: Avaliação da faixa de absorção no UV da azitromicina em diferentes comprimentos de onda, em diferentes concentrações do fármaco.

Pode-se notar que os perfis encontrados são muito próximos, o que impossibilitou a leitura de liberação. Contudo, seguiu-se o experimento de liberação para avaliar se é possível detectar, mesmo com a impossibilidade de quantificação, a liberação de azitromicina das nanopartículas sintetizadas. A Figura 8 mostra os perfis de liberação encontrados ao longo das 5 horas de liberação da azitrocimina.

Assim, conforme nota-se na Figura 8, é possível notar que o perfil do tampão é inferior aos perfis encontrados ao longo das 5 horas e, portanto, foi detectada a liberação de azitromicina pelas nanopartículas no meio. Entretanto, faz-se necessário que em estudos futuros seja quantificada a liberação de azitromicina por outras técnicas de análise.

Naproxeno

Antes do teste de dissolução das amostras de PMMA contendo naproxeno (NPX) uma curva analítica usando o UV-Vis foi construída. O fármaco livre foi pesado (50 mg) e solubilizado com o meio de dissolução (tampão fosfato pH 7,5) em balão volumétrico de 250ml.

$$
\begin{aligned}
50\,\text{mg de naproxeno} &\longrightarrow 250\,\text{ml} \\
x\,\text{mg de naproxeno} &\longrightarrow 1\,\text{ml} \\
x = 0,2\,\text{mg/ml} \quad &\text{ou} \quad 200\,\mu\text{g/ml} \quad \text{(Concentração da solução mãe)}
\end{aligned}
$$

Em seguida foram preparadas 5 diluições como mostra a Tabela 10. Esse fármaco possui intensa absorção no UV-Vis e por isso precisa de concentrações bem baixas para ser visto no UV dentro do limite de detecção da técnica.

Tabela 10: Concentração das diluições do fármaco preparadas.

Amostra	**Concentração (mg/ml)**
Sol. Mãe	200
D1	50
D2	25
D3	12,5
D4	6,25
D5	3,13

Em seguida, essas diluições foram levadas para um espectrofotômetro UV-Vis para a construção da curva analítica. Cada medição foi feita em triplicata no método de precisão sempre usando os 3 mesmos poços da placa de quartzo (D3; E3; F3). A média dos espectros de varredura de 200nm a 300nm são mostradas da Figura 9. Foi utilizada como referência a metodologia empregada para avaliar a liberação do Praziquantel (PZQ) (Farmacopeia Brasileira V2 - Monografias).

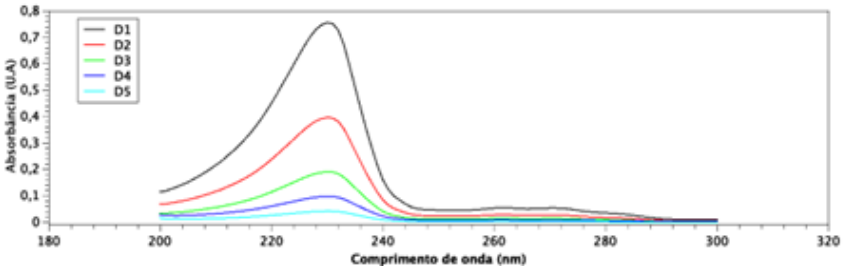


Figura 9: Espectros das diluições de naproxeno.

O comprimento escolhido para a construção da curva analítica foi de 230nm e os valores medidos são mostrados na Tabela 11 A curva analítica é mostrada na Figura D.5.

Tabela 11: Absorbâncias máximas associadas a cada concentração avaliada.

Amostra	Média de Absorbância	Concentração (mg/ml)
Tampão pH 7,5	0,1254 ± 0,002	0
D5	0,1659 ± 0,001	3,13
D4	0,2219 ± 0,001	6,25
D3	0,3147 ± 0,007	12,5
D2	0,5205 ± 0,005	25
D1	0,8801 ± 0,006	50

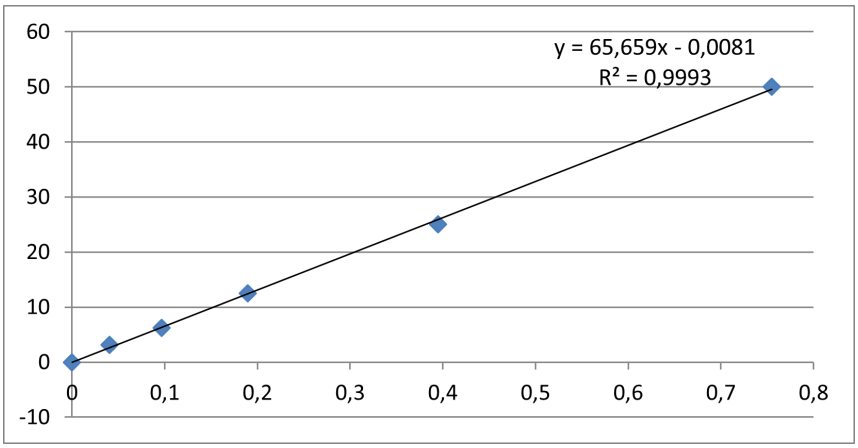


Figura 10: Curva analítica subtraindo o valor do tampão.

O ensaio de liberação foi conduzido em triplicata, sem reposição de meio, usando as seguintes condições: meio (tampão pH 7,5 - USP); volume (50 ml); massa de amostra (80 mg); temperatura (37 °C); tempo: 6 horas (coletas 1h; 2h; 3h; 4h; 5h; 6h); volume das alíquotas (1ml).

A curva de liberação do naproxeno é mostrada na Figura 11 e os dados são apresentados na Tabela 12.

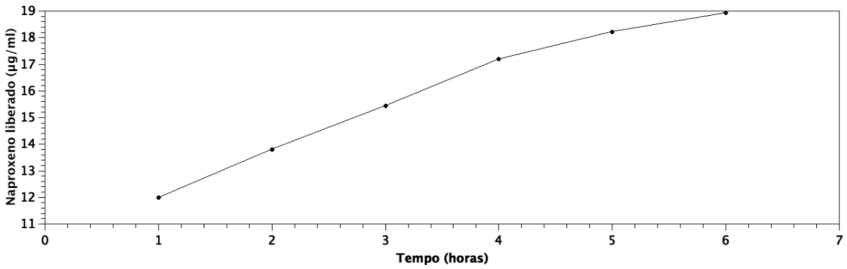


Figura 11: Curva de liberação do Naproxeno ao longo do tempo.

Quantidade de naproxeno inserida nas amostras: 3%, ou seja, a concentração máxima esperada em cada cuba seria de 48 mg/ml.

Tabela 12: Triplicata do teste de dissolução do naproxeno.

Tempo (h)	**Cuba (mg/ml)**			**Média (mg/ml)**	**Desvio (mg/ml)**
	1	2	3		
1	12,62744	11,321	12,01689	11,98844	0,533729
2	13,66252	13,81351	13,94263	13,80622	0,114469
3	15,43726	15,2797	15,60576	15,4409	0,133139
4	17,33892	16,91876	17,3236	17,19376	0,194555
5	18,58189	17,9801	18,10702	18,22301	0,259007
6	18,85762	18,50311	19,42221	18,92765	0,378474

$$80\,\text{mg de amostra} \longrightarrow 100\%$$
$$x_1\,\text{mg de amostra} \longrightarrow 3\%\,\text{de Naproxeno}$$
$$x_1 = 2,4\,\text{mg de Naproxeno} \quad \text{(massa máxima dentro de cada cuba)}$$

O teste foi feito em 50ml de tampão

$$2,4\,\text{mg de Naproxeno} \longrightarrow 50\,\text{ml de tampão}$$
$$x_2\,\text{mg de Naproxeno} \longrightarrow 1\,\text{ml}$$
$$x_2 = 0,048\,\text{mg/ml} \quad \text{ou} \quad 48\,\mu\text{g/ml} \quad \text{(conc. máx. dentro de cada cuba)}$$

A Figura 12 e a Tabela 13 apresentam os dados percentuais de liberação do fármaco.

Tabela 13: Percentual de Naproxeno liberado.

Tempo (h)	**Média**	**Desvio**	**% Liberado**
1	11,98844	0,533729	24,97592
2	13,80622	0,114469	28,76296
3	15,4409	0,133139	32,16855
4	17,19376	0,194555	35,82033
5	18,22301	0,259007	37,96459
6	18,92765	0,378474	39,43260

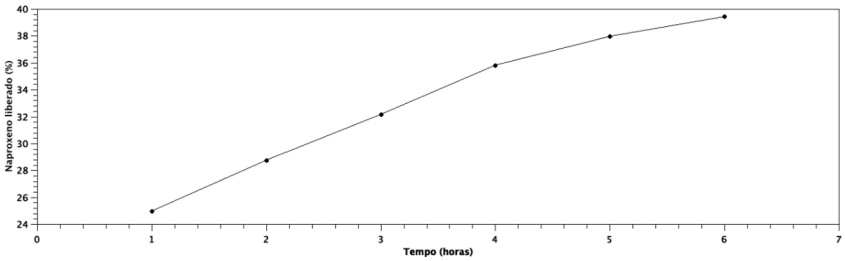


Figura 12: Curva de liberação do naproxeno ao longo do tempo.

Pode-se observar uma taxa de liberação inicial elevada, que decresce ao longo do ensaio.