

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

LETÍCIA DE MELO SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA RIFAMPICINA EM  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PMMA-PBMA OBTIDAS VIA  
POLIMERIZAÇÃO RAFT EM MINIEMULSÃO**

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

LETÍCIA DE MELO SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA RIFAMPICINA EM  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PMMA-PBMA OBTIDAS VIA  
POLIMERIZAÇÃO RAFT EM MINIEMULSÃO**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química

Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold  
Orientador

Porto Alegre

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Sampaio, Letícia de Melo  
Avaliação do perfil de liberação in vitro da  
rifampicina em nanopartículas poliméricas de PMMA-PBMA  
obtidas via polimerização RAFT em miniemulsão /  
Letícia de Melo Sampaio. -- 2022.  
58 f.  
Orientador: Cesar Liberato Petzhold.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Química, Bacharelado em Química, Porto Alegre,  
BR-RS, 2022.

1. Liberação controlada de fármacos. 2.  
Nanopartículas poliméricas. 3. Polimerização RAFT em  
miniemulsão. 4. Rifampicina. 5. Tuberculose. I.  
Petzhold, Cesar Liberato, orient. II. Título.

LETÍCIA DE MELO SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA RIFAMPICINA EM  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PMMA-PBMA OBTIDAS VIA  
POLIMERIZAÇÃO RAFT EM MINIEMULSÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso

Aprovado pela banca examinadora em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2022.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold  
Orientador

---

Prof. Dr. Tales da Silva Daitx  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Jessie Sobieski  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda a minha família pelo apoio e suporte durante todos esses anos, em especial à minha tia Bruna, minha avó Sonia, minhas primas Júlia e Sofia (cachudinhas mais lindas do mundo) e ao meu pai, Francisco. Vocês foram essenciais para o meu desenvolvimento. Agradeço especialmente à minha mãe, Luciana, por todo esforço e dedicação para que eu pudesse atingir meus objetivos. Você é a minha maior inspiração, meu exemplo de força e de determinação. Amo todos vocês.

Agradeço às pessoas que cruzaram o meu caminho durante esse período e que me marcaram de alguma forma, principalmente à Camis, Grasi, Karine, Tatiane e Vanessa. Obrigada por todas as conversas, risadas e momentos de descontração. Foi muito bom ter convivido com vocês.

Um agradecimento especial à Tatiane, mulher incrível que tive a sorte de conhecer. Obrigada por toda a companhia do dia a dia, carinho, paciência, compreensão, e por tornar a graduação um dos melhores momentos que já tive. Obrigada por fazer parte da minha vida, tenho muito orgulho de você e da sua trajetória.

Agradeço ao meu orientador, Cesar, por todas as conversas e os ensinamentos durante a minha jornada na graduação. Aprendi muito com você. Ao Tales, por aceitar o convite de participar da banca e de agregar ao trabalho desenvolvido e aos colegas do laboratório SINPOL por todo auxílio.

Por fim, agradeço às agências de fomento (CNPq, FAPERGS) e ao Instituto de Química pelo apoio à pesquisa desenvolvida.

## RESUMO

O sistema de liberação controlada de fármacos consiste em um método de dosagem de medicamentos, que apresenta diversas vantagens em relação ao método convencional, e as nanopartículas poliméricas vêm sendo bastante investigadas para atuarem como carreadoras nesses sistemas. A rifampicina, principal fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose, apresenta alguns aspectos farmacêuticos que reduzem sua eficiência, cujo sistema de liberação controlada é capaz de superar. Em trabalhos anteriores, a proposta de encapsular a rifampicina foi testada, mas os resultados obtidos revelaram um baixo perfil de liberação. O presente trabalho teve como objetivo investigar as possíveis causas do baixo perfil de liberação apresentado pelo fármaco a partir das nanopartículas poliméricas. Para isso, a estabilidade da rifampicina frente às condições de síntese das nanopartículas foi avaliada. Além disso, nanopartículas poliméricas foram sintetizadas com proporções molares distintas entre os monômeros metacrilato de metila e de butila, utilizando-se a técnica de Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação em miniemulsão, para verificar a influência da composição do copolímero na liberação do fármaco. Os resultados obtidos indicam que o fármaco permanece estável durante toda a síntese das nanopartículas, não sendo degradado no meio reacional. Os perfis de liberação do fármaco a partir das nanopartículas formadas com os copolímeros de proporções molares distintas entre os monômeros foram semelhantes. Apesar de ambos os copolímeros sintetizados apresentarem um valor de temperatura de transição vítrea favorável para o processo de liberação, o perfil de liberação obtido continua sendo baixo, o que indica que outros fatores devem estar reduzindo a eficiência esperada.

**Palavras-chave:** liberação controlada de fármacos; tuberculose; nanopartículas poliméricas; RAFT.

## ABSTRACT

Controlled drug delivery system consists of a drug dosage method, which has several advantages over the conventional method, and polymeric nanoparticles have been extensively investigated to act as carriers in these systems. Rifampicin, the main drug used for the treatment of tuberculosis, has some pharmaceutical aspects that reduce its efficiency, whose controlled delivery system is able to overcome. In previous works, the proposal to encapsulate rifampicin was tested, but the results obtained revealed a low release profile. The present work had as objective investigate the possible causes of the low release profile presented by the drug from polymeric nanoparticles. For this, the stability of rifampicin under the conditions of synthesis of nanoparticles was evaluated. In addition, nanoparticles were synthesized with different molar ratios between methyl and butyl methacrylate monomers, using reversible addition–fragmentation chain transfer miniemulsion technique, to verify the influence of the copolymer composition on drug release. The results obtained indicate that the drug remains stable throughout the synthesis of nanoparticles, not being degraded in the reaction medium. The drug release profiles from the nanoparticles formed with the copolymers of different molar proportions between the monomers were similar. Although both synthesized copolymers present a favorable glass transition temperature value for the release process, the release profile obtained remains low, which indicates that other factors must be reducing the expected efficiency.

**Keywords:** controlled drug delivery; tuberculosis; polymeric nanoparticles; RAFT.

## LISTA DE SIGLAS

AIBN - Azobisisobutironitrila

BMA - Metacrilato de butila

CPDA - Ácido 4-ciano-4-[(dodecil-sulfaniltiocarbonil)sulfanil] pentanóico)

CPDT - 2-ciano-2-propil dodecil tritiocarbonato

DLS - Espalhamento de luz dinâmico

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

MMA - Metacrilato de metila

$M_n$  - Massa molar numérica média

NP - Nanopartículas poliméricas

OMS - Organização mundial da saúde

ONU - Organização das nações unidas

PDI - Polidispersão

RAFT - Transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação

RMN - Ressonância magnética nuclear

SEC - Cromatografia de exclusão de tamanho

SLS - Lauril sulfato de sódio

SUS - Sistema único de saúde

TB - Tuberculose

TB-DS - Tuberculose suscetível a medicamentos

$T_g$  - Temperatura de transição vítrea

THF - Tetrahidrofurano

UV-Vis - Espectroscopia na região do ultravioleta e visível

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Financiamento para serviços de prevenção, diagnóstico e tratamento da TB para 137 países .....	16
Gráfico 2 - Mortes por tuberculose, incluindo em pessoas vivendo com HIV .....	18
Gráfico 3 - Tendências globais nas notificações de pessoas recém-diagnosticadas (preto) e número estimado de casos incidentes (verde) de TB .....	18
Gráfico 4 - Número global de pessoas relatadas como tendo sido tratadas para a TB.....	19
Gráfico 5 - Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes) no Brasil .....	20
Gráfico 6 - Proporção de encerramento dos casos novos de tuberculose pulmonar confirmados .....	20
Gráfico 7 - Curva de calibração da Rifampicina em THF .....	34
Gráfico 8 - Diagrama de estabilidade do fármaco isoladamente (1), na presença do iniciador (2), na presença do agente de transferência de cadeia (3) e na presença de ambos (4) .....	35
Gráfico 9 - Diagrama completo de estabilidade do fármaco .....	37
Gráfico 10 - Verificação da influência do AIBN (1) e do CPDT (2) nas absorvâncias obtidas em 475 nm .....	38
Gráfico 11 - Espectro de absorção do fármaco rifampicina antes e depois de submetido às condições reacionais .....	39
Gráfico 12 - Perfil de liberação do fármaco das nanopartículas com diferentes teores dos monômeros .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da rifampicina .....	22
Figura 2 - Estrutura da rifamicina B .....	22
Figura 3 - Representação de ambos os sistemas de administração de fármacos ....	25
Figura 4 - Representação do agente RAFT .....	27
Figura 5 - Variação do espectro UV-Vis da rifampicina com o pH .....	40
Figura 6 - Resultados espalhamento de luz para as nanopartículas referentes às reações 5 (a) e 6 (b) .....	45
Figura 7 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) para o copolímero sintetizado com proporção molar 40:60 .....	46
Figura 8 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) para o copolímero sintetizado com proporção molar 20:80 .....	46
Figura 9 - Curva de DSC do copolímero de proporção molar 40:60 .....	48
Figura 10 - Curva de DSC do copolímero de proporção 20:80 .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reações modelo para avaliação da estabilidade da rifampicina .....	29
Tabela 2 - Avaliação da influência dos reagentes nos valores de absorbância .....	30
Tabela 3 - Sínteses e caracterização das nanopartículas poliméricas na proporção molar 20:80 (MMA:BMA) obtidas via polimerização RAFT em miniemulsão .....	43
Tabela 4 - Temperatura de transição vítrea dos copolímeros sintetizados .....	49
Tabela 5 - Resultados do teste de extração do fármaco realizado com as NP com proporção 40:60 (MMA:BMA) .....	50
Tabela 6 - Resultados do teste de extração do fármaco realizado com as NP com proporção 20:80 (MMA:BMA) .....	50
Tabela 7 - Teor de fármaco incorporado pelas NP .....	51

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1	GERAIS.....	14
2.2	ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1	TUBERCULOSE .....	15
3.2	NEGLIGÊNCIA.....	15
3.3	TUBERCULOSE EM TEMPOS DE COVID-19 .....	17
3.4	TUBERCULOSE NO BRASIL .....	19
3.5	TRATAMENTO DA TUBERCULOSE .....	20
3.6	RIFAMPICINA .....	21
3.7	RIFAMPICINA NO COMBATE À TUBERCULOSE .....	22
3.8	PROBLEMAS RELACIONADOS AO FÁRMACO .....	23
<b>3.8.1</b>	<b>Biodisponibilidade e autoindução da depuração</b> .....	<b>23</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Toxicidade</b> .....	<b>24</b>
3.9	PROPOSTA .....	24
<b>3.9.1</b>	<b>Liberção controlada de fármacos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Nanopartículas poliméricas</b> .....	<b>26</b>
<b>3.9.3</b>	<b>Polimerização RAFT em miniemulsão</b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
4.1	INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO.....	28
4.2	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	30
<b>4.2.1</b>	<b>Caracterização das nanopartículas poliméricas</b> .....	<b>31</b>
4.3	EXTRAÇÃO DO FÁRMACO .....	32
4.4	LIBERAÇÃO DO FÁRMACO .....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>

5.1	INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO.....	33
5.2	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	40
5.2.1	<b>Massa molar .....</b>	<b>44</b>
5.2.2	<b>Tamanho de partícula .....</b>	<b>44</b>
5.2.3	<b>Ressonância Magnética Nuclear .....</b>	<b>45</b>
5.2.4	<b>Calorimetria Exploratória Diferencial .....</b>	<b>47</b>
5.3	EXTRAÇÃO DO FÁRMACO .....	49
5.4	LIBERAÇÃO DO FÁRMACO .....	51
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A rifampicina, fármaco utilizado no presente trabalho, é um medicamento indicado para o tratamento da tuberculose, doença que, por ser endêmica principalmente em populações de baixa renda, possui investimento reduzido em pesquisa, produção de medicamentos e vacinas por conta do baixo potencial de retorno lucrativo.

Apesar de importante e eficaz para o tratamento dessa enfermidade, a rifampicina apresenta problemas relacionados à biodisponibilidade e à toxicidade, aspectos farmacêuticos que reduzem sua eficiência.

Os números ocasionados pela tuberculose na sociedade atual, embora seja uma doença antiga, evitável e tratável, continuam sendo preocupantes. Sendo assim, é necessário desenvolver estratégias para otimização dos tratamentos existentes. Surge então, a proposta do presente trabalho, de encapsular o fármaco em nanopartículas poliméricas, promovendo assim, sua liberação de forma controlada.

As nanopartículas poliméricas vêm sendo bastante investigadas para atuarem como carreadoras em sistemas de liberação controlada de fármacos, podendo estes sistemas serem desenvolvidos utilizando-se diferentes polímeros, de natureza biodegradável ou não. Dentre os principais polímeros utilizados para essa tecnologia de liberação, encontram-se os polímeros acrílicos, que pertencem à classe dos polímeros sintéticos e não degradáveis, sendo bastante empregados devido à biocompatibilidade que apresentam.

No presente trabalho, as nanopartículas poliméricas serão sintetizadas utilizando-se os monômeros metacrilatos de metila (MMA) e de butila (BMA), obtidas a partir da polimerização por transferência reversível de cadeia por adição – fragmentação (RAFT), técnica radicalar bastante versátil para obter polímeros de maneira controlada. Além de utilizarmos a polimerização RAFT, trabalharemos em específico com a técnica de polimerização em miniemulsão, escolhida pelo fato de que o polímero final é obtido em forma de nanopartículas esféricas, sendo o ideal para a proposta apresentada.

A tecnologia de liberação controlada de fármacos, por sua vez, introduzida pelo termo que ficou conhecido por *drug delivery system*, proporciona diversas vantagens em relação ao método de dosagem convencional. Como por exemplo, esse sistema é capaz de diminuir significativamente a toxicidade do medicamento, apresentando, portanto, uma administração mais segura.

A proposta apresentada, de encapsular a rifampicina em nanopartículas poliméricas para promover a liberação controlada desse fármaco, já havia sido realizada anteriormente em nosso grupo de pesquisa. Porém, apesar das nanopartículas terem sido sintetizadas com elevados rendimentos e terem sido bem caracterizadas, o perfil de liberação observado para o fármaco era baixo. Os testes de liberação realizados revelaram que somente cerca de 40% do fármaco encapsulado era liberado pelas nanopartículas, enquanto que, idealmente, a liberação precisa ser quantitativa.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo geral investigar as possíveis causas do baixo perfil de liberação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAIS**

O presente trabalho tem como objetivo geral investigar as possíveis causas do baixo perfil de liberação apresentado pelo fármaco a partir das nanopartículas poliméricas. A investigação será realizada através dos seguintes objetivos específicos:

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Avaliação da estabilidade da rifampicina frente às condições reacionais da polimerização;
- Síntese e caracterização de novas nanopartículas poliméricas, obtidas via polimerização RAFT em miniemulsão, utilizando-se a proporção molar de 20:80 (MMA:BMA) entre os monômeros;
- Avaliação da liberação do fármaco a partir das novas nanopartículas sintetizadas;

- Comparação dos perfis de liberação, obtidos a partir das nanopartículas sintetizadas com a nova proporção molar e a partir das nanopartículas sintetizadas com a proporção molar originalmente proposta.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Antes de dar início às discussões a respeito dos testes realizados e dos resultados obtidos, é preciso entender a relevância do presente estudo.

Para isso, primeiramente, alguns aspectos relacionados à doença serão abordados, trazendo dados relevantes a respeito da sua história e da sua manifestação na sociedade. Além disso, será possível ter uma visão geral dos quadros no Brasil e no mundo e entender o que as autoridades têm proposto para o combate à doença.

#### 3.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa e transmissível que afeta principalmente os pulmões, embora também possa acometer outros órgãos e/ou sistemas, causada pela espécie de bactéria patogênica *Mycobacterium tuberculosis*, ou bacilo de Koch, em homenagem ao Dr. Robert Koch, bacteriologista alemão que a descreveu pela primeira vez em 1882.<sup>1</sup>

Conforme relatado pela literatura, a doença é uma das mais antigas existentes, acometendo a humanidade há mais de 5.000 anos, e seus primeiros indícios foram identificados em múmias do Egito datadas de 3.400 a.C..<sup>1,2</sup>

Apesar de evitável e curável, a tuberculose continua sendo uma das doenças infecciosas mais mortais do mundo, acometendo cerca de 30.000 pessoas por dia, e levando cerca de 4.000 a óbito.<sup>3</sup>

#### 3.2 NEGLIGÊNCIA

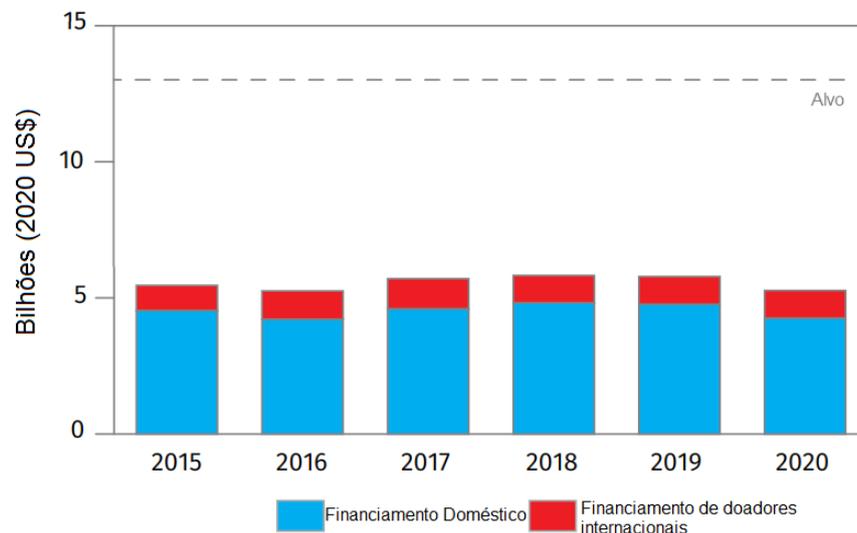
Embora seja uma doença extremamente antiga, a tuberculose continua sendo um grande desafio e um problema de saúde pública no mundo. O desafio no combate à doença está relacionado, principalmente, a falta evidente de recursos investidos, que continuam não sendo suficientes.<sup>3,4</sup>

De acordo com a literatura, alguns indicadores socioeconômicos como a baixa escolaridade, a carência alimentar e a imigração estão relacionados com a ocorrência dessa doença.<sup>5</sup> A constatação de que a doença afeta principalmente as pessoas mais pobres, referidas atualmente como populações negligenciadas,<sup>4</sup> está diretamente relacionada com a falta de investimentos no combate à doença.

O Gráfico 1 demonstra a falta de financiamento em países de baixa e média renda, que atualmente, corresponde a menos da metade (41%) da meta global estabelecida pela Organização das Nações Unidas (ONU).

Essa negligência em relação à doença faz com que ela se encaixe perfeitamente na definição de doenças negligenciadas, que são enfermidades, causadas por agentes infecciosos ou parasitas, consideradas endêmicas principalmente em populações de baixa renda, possuindo, assim, níveis de investimentos reduzidos em pesquisa e produção de medicamentos para seu controle.<sup>6</sup>

Gráfico 1 - Financiamento para serviços de prevenção, diagnóstico e tratamento da TB para 137 países<sup>a</sup>.



<sup>a</sup>Os 137 países são de baixa e média renda e foram responsáveis por 98% dos casos de TB oficialmente notificados do mundo em 2020.

Alvo: meta global estabelecida na reunião de alto nível da ONU sobre tuberculose, de 13 bilhões de dólares por ano.

Fonte: World Health Organization, 2021.<sup>7</sup>

Apesar disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não considera a tuberculose como uma doença negligenciada,<sup>8</sup> o que é um tema considerado polêmico por alguns autores, considerando que a doença é responsável por um alto índice de mortalidade nas populações mais pobres.<sup>4</sup>

A própria diretora do Programa Global de TB da OMS, Dra. Tereza Kasaeva, alega: “[...] estamos preocupados com as crescentes taxas de pobreza, desigualdade, desnutrição, comorbidades, discriminação e estigma que são os principais impulsionadores da epidemia de tuberculose.”<sup>3</sup> O que reforça, ainda mais, a preponderância da doença em populações desfavorecidas e leva à necessidade do desenvolvimento de mais pesquisas.

### 3.3 TUBERCULOSE EM TEMPOS DE COVID-19

Há alguns anos atrás, a tuberculose havia se tornado a doença infecciosa que mais matava em todo o mundo, sendo denominada como a mais letal da atualidade.<sup>9</sup> Com a chegada da pandemia do novo coronavírus (SARS-CoV-2), atualmente, a tuberculose é a segunda doença infecciosa mais mortal, perdendo apenas para a COVID-19.<sup>10,11</sup>

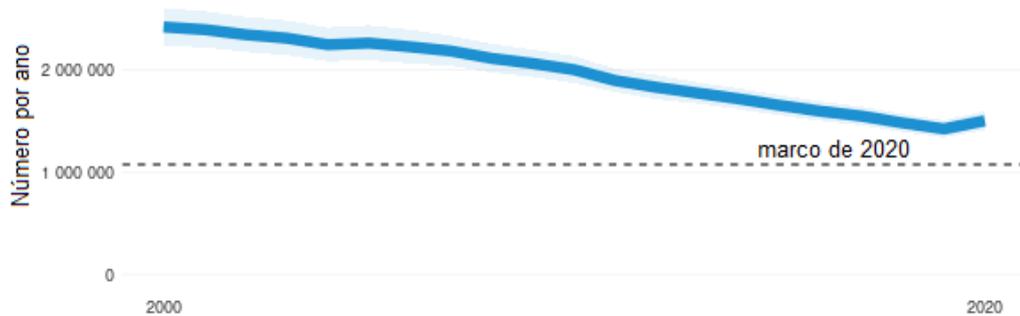
Acontece que, com o surgimento do coronavírus, as atenções e esforços no mundo inteiro se voltaram para o combate dessa nova doença infecciosa, causada pelo vírus SARS-CoV-2, criando ainda mais dificuldades para o controle da tuberculose. De acordo com uma reportagem publicada pela OMS, no final do ano de 2021, “a pandemia de COVID-19 reverteu anos de progresso global no combate à tuberculose e, pela primeira vez em mais de uma década, as mortes por tuberculose aumentaram [...]”.<sup>11</sup>

Anualmente, desde 1997, a OMS publica um relatório global da tuberculose, fornecendo uma avaliação abrangente e atualizada da situação dessa epidemia. O relatório mais recente disponível, publicado em 2021, trouxe os números completos e atualizados referentes ao ano de 2020, sendo possível analisar o real impacto da pandemia de COVID-19 na epidemia de TB.<sup>7</sup>

Através do relatório é possível confirmar que em 2020 mais pessoas morreram de TB em comparação com 2019. O Gráfico 2, representado abaixo,

evidencia esse aumento do número de mortes, que seguia uma tendência de queda há mais de uma década.

Gráfico 2 - Mortes por tuberculose, incluindo em pessoas vivendo com HIV.

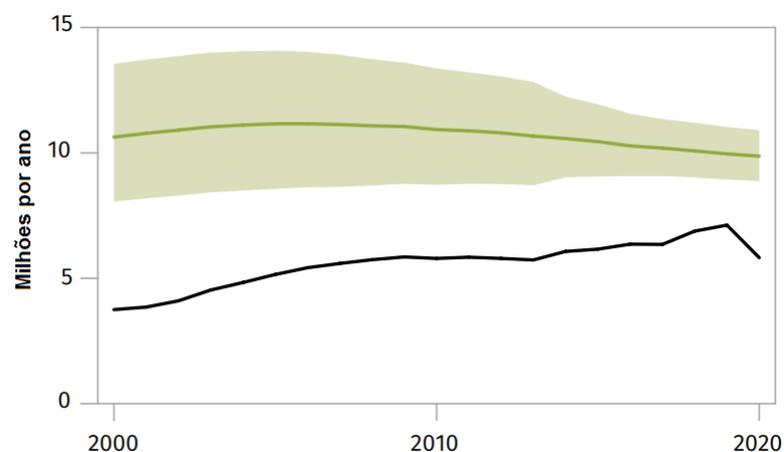


Fonte: World Health Organization, 2020.<sup>12</sup>

Além do aumento do número de mortes, em 2020, menos pessoas foram diagnosticadas e tratadas da tuberculose em comparação a 2019. Esses dados estão presentes nos Gráficos 3 e 4 representados a seguir, respectivamente.

Infelizmente, os serviços de TB estão entre os que foram interrompidos pela pandemia do COVID-19 em 2020, e as consequências trazidas, conforme demonstrado, precisam de atenção especial. Sendo assim, daqui para frente, novos desafios foram incorporados na luta contra a tuberculose, e estes precisam ser superados para acabar com os números alarmantes dessa doença, que apesar de antiga, evitável e tratável, continua causando muitos prejuízos.

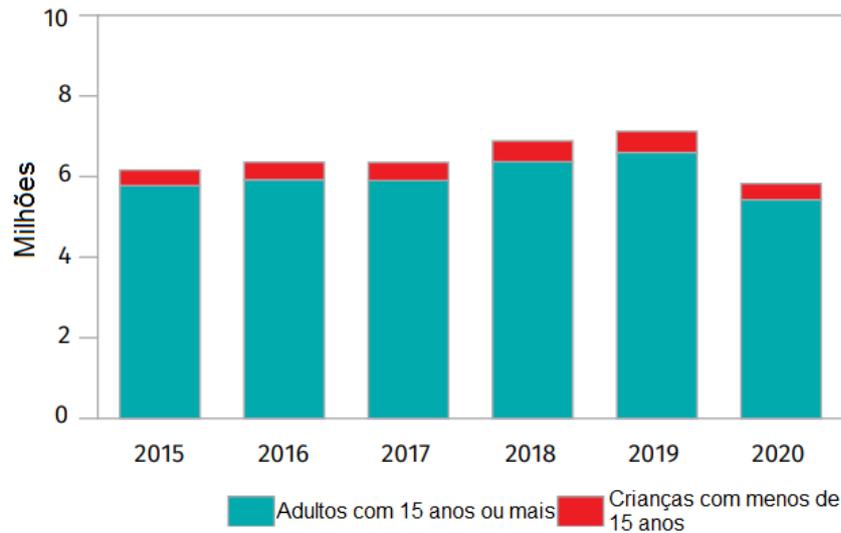
Gráfico 3 - Tendências globais nas notificações de pessoas recém-diagnosticadas (preto) e número estimado de casos incidentes (verde) de TB.



A área sombreada representa o intervalo de incerteza.

Fonte: World Health Organization, 2021.<sup>7</sup>

Gráfico 4 - Número global de pessoas relatadas como tendo sido tratadas para a TB.



Fonte: World Health Organization, 2021.<sup>7</sup>

### 3.4 TUBERCULOSE NO BRASIL

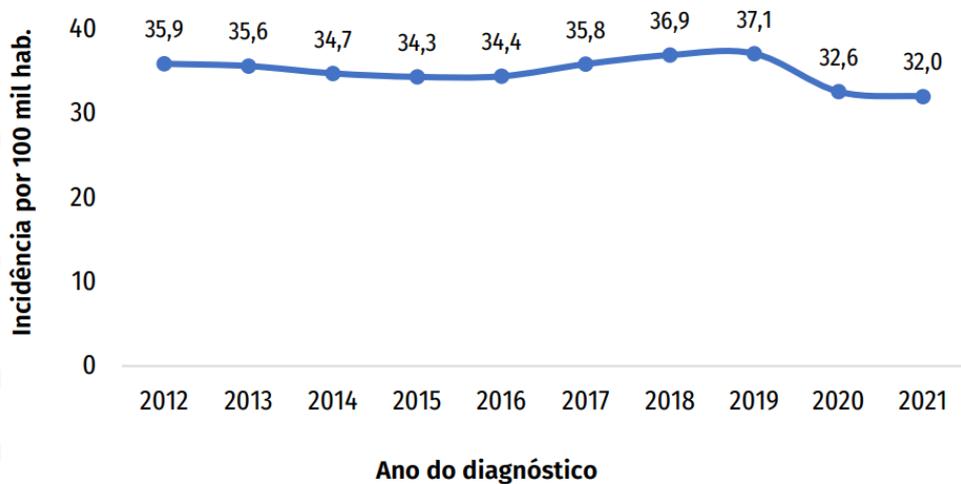
Em relação à tuberculose no Brasil, estudos mostram que não existe nenhuma evidência de ocorrência da doença nas populações indígenas antes da invasão de Portugal em 1.500, podendo-se afirmar, seguramente, que foi trazida para cá pelos portugueses.<sup>1,13,14</sup> Atualmente, o Brasil está entre os 30 países com a maior carga de tuberculose do mundo.<sup>7</sup>

O Boletim Epidemiológico de Tuberculose, publicado em março desse ano pelo Ministério da Saúde, descreve a situação atual da doença no país. Através deste, é possível constatar-se um decréscimo da notificação de casos de TB no Brasil em 2021 em comparação com o ano de 2020. Esse decréscimo se refletiu na queda do coeficiente de incidência da doença no país, evidenciado pelo Gráfico 5.

Além disso, a diminuição da proporção de cura entre os casos novos pode ser evidenciada através do Gráfico 6.

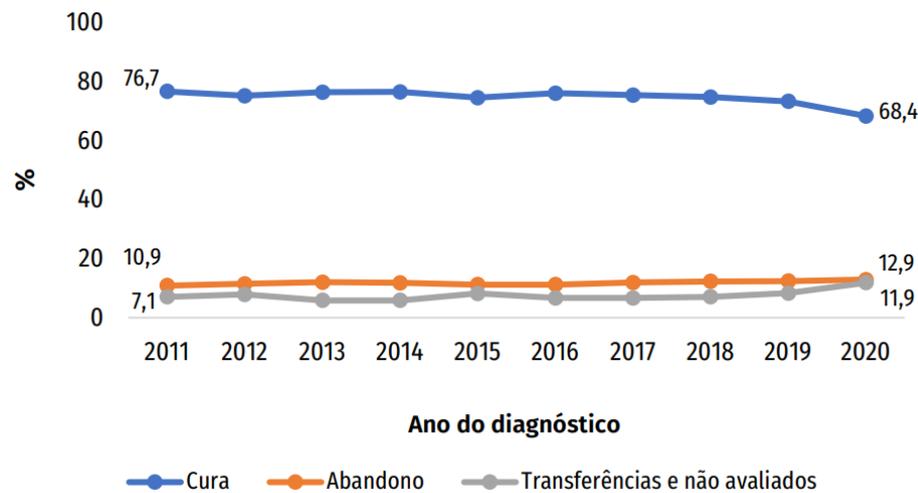
A tendência observada para esses dados são as mesmas expostas no relatório global da tuberculose publicado pela OMS, o que reforça ainda mais as consequências da pandemia de COVID-19 para a epidemia de tuberculose.

Gráfico 5 - Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes) no Brasil.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022.<sup>15</sup>

Gráfico 6 - Proporção de encerramento dos casos novos de tuberculose pulmonar confirmados.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022.<sup>15</sup>

Sendo assim, com a apresentação desses dados, fica clara a importância do presente trabalho, que vai ao encontro da necessidade urgente do desenvolvimento de estudos que ajudem no combate à doença.

### 3.5 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Depois de elucidar alguns aspectos relevantes relacionados à tuberculose, enfatizando a gravidade da doença na sociedade atual, para que seja possível propor uma melhoria no tratamento, é preciso entender como ele ocorre.

O tratamento da tuberculose é realizado com base nas orientações dadas pela OMS. As Diretrizes Consolidadas da OMS sobre Tuberculose, atualizada em 2022, inclui um conjunto abrangente de recomendações, trazendo informações a respeito do tratamento da tuberculose suscetível a medicamentos (TB-DS). De acordo com o documento, essa atualização reúne, sem modificações, todas as recomendações válidas e baseadas em evidências das diretrizes de 2010 e 2017, adicionando-se somente uma nova seção de recomendações para os tratamentos de 4 meses.<sup>16</sup>

Desde 2010, a indicação para o tratamento de pessoas com TB-DS consiste em um regime de 6 meses composto por quatro medicamentos de primeira linha – isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida – onde a rifampicina é utilizada por 6 meses. Esse regime tem sido amplamente adotado em todo o mundo por ser fortemente recomendado e pela alta certeza de evidência, em que aproximadamente 85% dos pacientes terão um resultado bem-sucedido.<sup>16</sup>

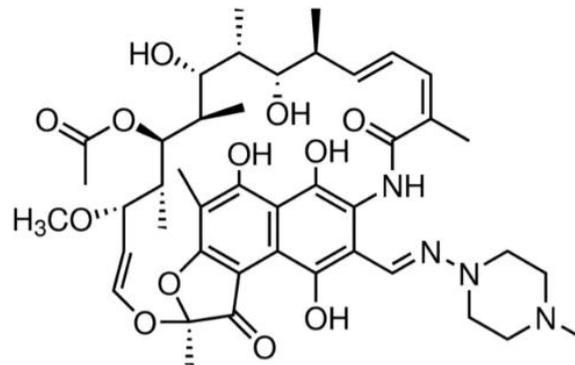
No Brasil, o tratamento é gratuito e está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo realizado com base no regime de 6 meses descrito.<sup>17</sup>

### 3.6 RIFAMPICINA

A rifampicina foi o fármaco escolhido como objeto de estudo do presente trabalho. Sendo assim, neste item serão apresentados alguns aspectos relacionados à sua descoberta. Além disso, sua importância histórica no tratamento da tuberculose será relatada, e em seguida, os problemas que o fármaco apresenta serão abordados. O conhecimento desses problemas é de extrema importância para o entendimento da proposta do trabalho, que visa melhorar a eficiência da droga.

A rifampicina, cuja estrutura está representada na Figura 1, é um medicamento que apresenta propriedades antibacterianas, inibindo a multiplicação de bactérias.<sup>18,19</sup> Descoberta em 1965, sua atividade antimicrobiana foi inicialmente comprovada *in vitro* e posteriormente, numerosos estudos *in vivo* mostraram suas propriedades bactericidas, sendo a primeira droga no final da década de 1960 a tratar pacientes que sofriam de tuberculose pulmonar crônica resistente a medicamentos.<sup>20</sup>

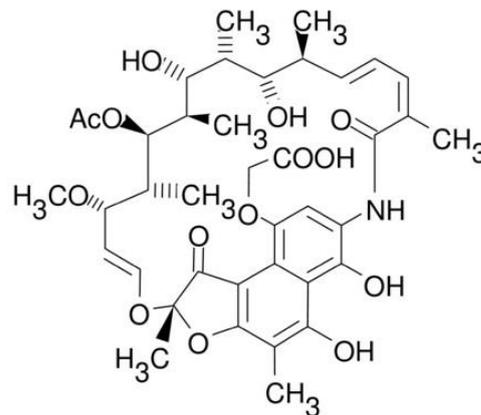
Figura 1 - Estrutura da rifampicina.



Fonte: Autora.

Esse antibiótico macrocíclico semissintético é derivado da rifamicina B, molécula representada na Figura 2, isolada pela primeira vez em 1959, produzida pela bactéria atualmente classificada como *Amycolatopsis mediterranei*.<sup>21,22</sup>

Figura 2 - Estrutura da rifamicina B.



Fonte: Autora.

Apesar da rifampicina ser indicada para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos sensíveis a esse composto, possuindo ação comprovada contra diversas bactérias, sua utilização é quase exclusiva para o tratamento da hanseníase (*Mycobacterium leprae*) e da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*).<sup>18</sup>

### 3.7 RIFAMPICINA NO COMBATE À TUBERCULOSE

A importância da rifampicina para o tratamento da tuberculose é extremamente relatada pela literatura, e a droga continua sendo uma das mais utilizadas para esse fim. O início da implementação da administração de rifampicina

no regime de tratamento dessa doença se deu em 1966, na tentativa de tratar pacientes que sofriam de TB pulmonar crônica resistente a medicamentos, conforme mencionado anteriormente.<sup>20</sup>

A utilização desse fármaco para o tratamento da tuberculose, que foi iniciada em meio ao desespero expresso pelos médicos para tratá-la com sucesso, ocorre desde então, sendo o esquema de tratamento de 6 meses introduzido em 1979.<sup>13</sup>

### 3.8 PROBLEMAS RELACIONADOS AO FÁRMACO

Apesar de sua importância histórica, a rifampicina apresenta alguns aspectos farmacêuticos que reduzem sua eficiência. Esses problemas relacionados ao fármaco serão mostrados a seguir, sendo essa exposição necessária para o entendimento da proposta do presente trabalho.

#### 3.8.1 Biodisponibilidade e autoindução da depuração

Biodisponibilidade é um termo utilizado para descrever a quantidade e a taxa na qual o princípio ativo é absorvido a partir de uma forma farmacêutica, alcançando a circulação sistêmica e tornando-se disponível para atuação.

Em contrapartida, a depuração (ou *clearance*) consiste em uma atividade de limpeza ou exclusão de substâncias indesejáveis do nosso organismo. A eliminação dessas substâncias é exercida pelo rim ou pelo fígado, sendo um parâmetro que integra os fenômenos de metabolização e excreção da droga.

Acontece que, conhecidamente, a rifampicina apresenta uma excelente biodisponibilidade oral após a administração de dose única, em que cerca de 95% do fármaco administrado é absorvido. Entretanto, sua biodisponibilidade diminui para 70% após administrações repetidas.<sup>23</sup>

Essa diminuição da biodisponibilidade do fármaco, que acontece após um período de cerca de três semanas de tratamento, é ocasionada por uma autoindução da depuração. Ou seja, o próprio fármaco causa uma indução de enzimas hepáticas responsáveis pela sua metabolização, ocasionando uma redução nos níveis plasmáticos da droga.<sup>23,24</sup>

Ainda segundo a literatura, o fenômeno de autoindução descrito, além de promover um aumento do *clearance* da rifampicina, reduzindo sua biodisponibilidade, ocasiona uma redução do tempo de meia vida do medicamento. Essas consequências podem, ainda, resultar em um tipo de tolerância farmacocinética e levar a níveis subterapêuticos do fármaco.<sup>24,25,26</sup>

### **3.8.2 Toxicidade**

Infecções cujos tratamentos são baseados em antimicrobianos apresentam, conhecidamente, problemas relacionados à toxicidade em tecidos saudáveis. Apesar de a rifampicina ser um antibiótico valioso e seguro, com relativamente poucos efeitos adversos importantes, ela apresenta certa toxicidade, constituindo assim, o outro principal problema que o fármaco apresenta.

Conforme relatado pela literatura, a toxicidade desse fármaco é predominantemente hepática, cujos efeitos imunoalérgicos geralmente estão associados à terapia intermitente ou prolongada.<sup>27</sup> A hepatotoxicidade observada durante o tratamento com rifampicina relatada anteriormente, apresentou grande variabilidade, ocorrendo desde elevação discreta de aminotransferases até hepatite, por vezes grave.<sup>28,29</sup>

De acordo com a bula do medicamento, quando o fármaco é administrado concomitantemente com isoniazida (medicamento presente no regime de tratamento da tuberculose), o potencial para hepatotoxicidade é aumentado.<sup>18,19</sup>

Portanto, essa toxicidade do fármaco faz com que sua utilização precise ser evitada nos pacientes com insuficiência hepática. Além disso, os pacientes com tuberculose tratados com o regime indicado pela OMS precisam ser rigorosamente monitorados.<sup>18,19,29</sup>

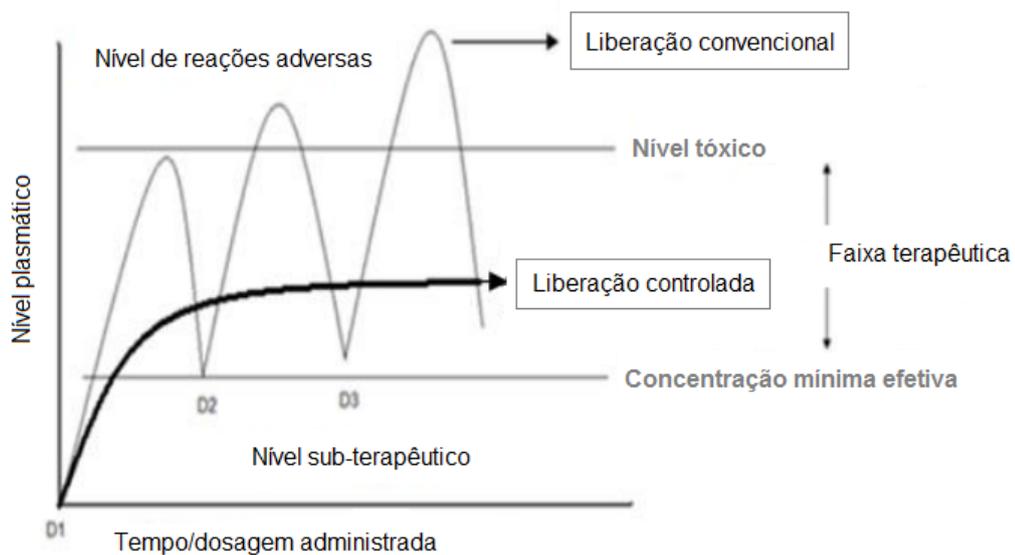
## **3.9 PROPOSTA**

Finalmente, dada à importância histórica da rifampicina no tratamento da tuberculose e sabendo-se dos problemas farmacêuticos que apresenta, a proposta do presente trabalho consiste em encapsular o fármaco em nanopartículas (NP) poliméricas, propiciando um sistema de liberação controlada, aumentando assim, sua eficiência.

### 3.9.1 Liberação controlada de fármacos

O sistema de liberação controlada de fármacos consiste em um método de dosagem de medicamentos, conhecido por *drug delivery system*, que apresenta diversas vantagens em relação ao método convencional.<sup>30,31,32,33</sup> Dentre as vantagens observadas, essa tecnologia é capaz de promover a redução da toxicidade de fármacos, que conforme descrito anteriormente, é exatamente um dos problemas que a rifampicina apresenta.

Figura 3 - Representação de ambos os sistemas de administração de fármacos.



Fonte: SILVA, Ingrid Dantas Vasconcelos, 2014.<sup>34</sup>

A Figura 3 representa o funcionamento de ambos os métodos de administração no nosso organismo, e é possível observar as principais características e diferenças relacionadas a essas formas de liberação.

Na administração convencional, que é o método atual de dosagem da rifampicina, o agente terapêutico é liberado rapidamente no organismo, o que faz com que o nível plasmático da droga aumente em um curto intervalo de tempo, até atingir o nível máximo. Logo após, sua concentração começa a cair, sendo necessário administrar uma nova dose para que o nível do fármaco se mantenha acima da concentração mínima efetiva, e assim o processo se repete durante todo o tratamento.<sup>31,32</sup>

Segundo a literatura, para esse método de dosagem, manter os níveis de concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica continua sendo um desafio<sup>32</sup>.

De fato, conforme representado, a repetição do processo de administração pode fazer com que a concentração da droga seja tão elevada que ultrapasse o nível tóxico, levando a efeitos adversos durante o tratamento, como é o caso da utilização da rifampicina no tratamento da tuberculose.

Em contrapartida, conforme representado pela Figura 3, no sistema de liberação controlada, a liberação do fármaco ocorre de forma lenta e gradual, fazendo com que esse sistema seja capaz de manter a concentração da droga dentro da faixa terapêutica por um longo período de tempo, com a administração de somente uma dose, minimizando, portanto, a ocorrência de efeitos adversos relacionados à toxicidade do fármaco.<sup>31,32</sup>

### **3.9.2 Nanopartículas poliméricas**

Para que seja possível promover a liberação controlada de um fármaco é preciso associá-lo a um carreador. No presente trabalho, os carreadores da rifampicina serão nanopartículas poliméricas, sendo responsáveis, portanto, por promover a liberação lenta e gradual da droga no organismo, de modo que sua toxicidade seja reduzida.

Os materiais de natureza polimérica, conforme relatado pela literatura, têm sido bastante investigados por pesquisadores para a obtenção de dispositivos que possam ser utilizados como suportes no sistema de liberação controlada. Dentre eles, especialmente, os sistemas poliméricos nano/microparticulados já são empregados com sucesso no processo de encapsulamento de uma grande variedade de fármacos, incluindo, como por exemplo, anticancerígenos, antifúngicos, analgésicos, anti-inflamatórios e, inclusive, alguns antibióticos.<sup>33</sup>

Ainda conforme a literatura, ao mesmo tempo em que as nanopartículas poliméricas agem como um veículo para a droga, são capazes de evitar a inativação prematura do fármaco durante o seu transporte, protegendo-o de meios físico-químicos e enzimáticos.<sup>33</sup> Sendo assim, além de auxiliar na redução da toxicidade do fármaco, por terem uma capacidade de proteger o fármaco, as nanopartículas seriam capazes de ajudar a resolver o outro grande problema que reduz a eficiência da rifampicina: a redução de sua biodisponibilidade, que conforme discutido anteriormente, é ocasionada pelo próprio fármaco, que induz as enzimas hepáticas

responsáveis pela sua metabolização, ocasionando uma redução nos níveis plasmáticos da droga.

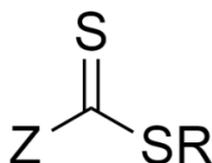
### 3.9.3 Polimerização RAFT em miniemulsão

Para que o sistema de liberação controlada seja efetivo, é necessário que o fármaco esteja disperso uniformemente nas nanopartículas poliméricas<sup>32</sup>, de modo que a quantidade de fármaco liberada e o perfil de liberação não variem de uma nanopartícula para a outra. Para isso, as nanopartículas poliméricas sintetizadas precisam ser uniformes, apresentando, portanto, baixo índice de polidispersão em termos de massa molar e de tamanho de partícula.

Dentre as diversas técnicas disponíveis para a síntese de polímeros, a polimerização por Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT) é uma técnica radicalar bastante versátil para obtenção de polímeros de maneira controlada, proporcionando excelente controle em relação ao tamanho das cadeias formadas<sup>35,36,37</sup>.

O que garante o controle nas reações de polimerização RAFT é o fato de que estas exibem características de uma polimerização viva, em que a etapa de terminação, que ocasiona a terminação das espécies propagadoras, é mantida em níveis reduzidos. Para isso, é necessário utilizar um agente de transferência de cadeia (ou agente RAFT), composto químico, representado pela Figura 4, que possui uma função tiocarbonila (ZC(=S)SR) ligada a dois grupos distintos, normalmente representados como sendo um grupo “Z” (que ativa a dupla ligação C=S) e um grupo “R” (que deve ser um bom grupo de saída)<sup>35,36,37</sup>.

Figura 4 - Representação do agente RAFT.

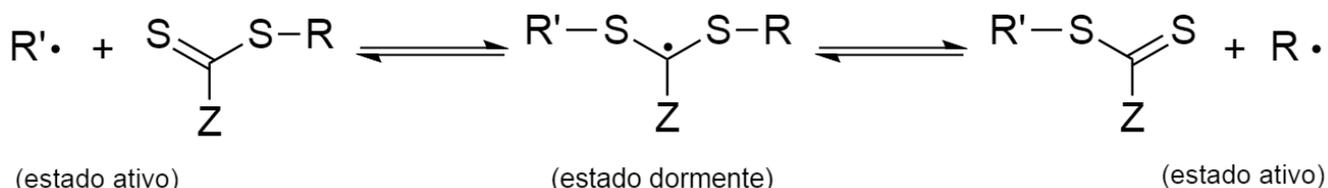


Fonte: Autora.

O mecanismo da polimerização está representado pelo Esquema 1, refletindo a importância do agente RAFT. Por conta da adição desse agente ao meio reacional, as cadeias em crescimento são reversivelmente desativadas, alternando

entre estados ativos e dormentes. O crescimento das cadeias ocorre apenas quando se encontram no estado ativo, e o controle em relação ao tamanho das cadeias poliméricas formadas se deve a esse equilíbrio estabelecido.

Esquema 1 - Representação do mecanismo da polimerização RAFT.



Fonte: Autora.

Sendo assim, devido à necessidade de controle em relação às nanopartículas formadas, essa técnica de polimerização foi escolhida para sintetizá-las. Além de utilizar a técnica de polimerização RAFT, trabalharemos em específico com a polimerização em miniemulsão direta, que consiste na dispersão de um monômero hidrofóbico em água levando a formação de gotas hidrofóbicas, com dimensões de 50 a 500 nm. A polimerização em miniemulsão foi escolhida pelo fato de que o polímero final é obtido em forma de nanopartículas esféricas, sendo o ideal para a proposta apresentada<sup>36,37</sup>.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO

Para investigar a estabilidade do fármaco durante a síntese das nanopartículas, considerando que este está presente durante toda a reação de polimerização, uma série de reações modelo foi realizada, todas em triplicata, submetendo o fármaco às mesmas condições reacionais utilizadas originalmente na polimerização, sendo elas: 70 °C durante 6h em atmosfera inerte. Porém, combinações distintas dos reagentes necessários para a síntese das nanopartículas foram utilizadas. O solvente dessas reações foi o tetrahydrofurano (THF).

As reações modelo foram realizadas com a mesma quantidade de massa teórica necessária para a síntese das nanopartículas, sendo mantida assim, a proporção entre os reagentes. O volume de THF utilizado foi 5 mL e as reações realizadas estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Reações modelo para avaliação da estabilidade da rifampicina.

Reações	Fármaco	Iniciador <sup>1</sup>	Agente de transferência de cadeia <sup>2</sup>
1	✓	x	x
2	✓	✓	x
3	✓	x	✓
4	✓	✓	✓

✓: Reagente utilizado na respectiva reação modelo

x: Reagente não utilizado na respectiva reação modelo

<sup>1</sup>O iniciador utilizado na reação de polimerização é o azobisisobutironitrila (AIBN)

<sup>2</sup>O agente de transferência de cadeia utilizado foi o 2-ciano-2-propil dodecil tritio carbonato (CPDT)

Fonte: Autora.

Durante a realização de cada reação, foram retiradas alíquotas de 2 em 2h e as mesmas foram analisadas através de espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) em 475 nm para verificar a presença da droga. As alíquotas retiradas foram de 0,1 mL, sendo posteriormente diluídas em 5 mL de THF.

Adicionalmente, a reação 4 da Tabela 1, em que o fármaco foi submetido às condições reacionais da polimerização na presença tanto do iniciador quanto do agente de transferência de cadeia, foi realizada novamente, também em triplicata. Porém, para essa repetição da reação, foram retiradas duas alíquotas, uma inicial e uma final, e ao invés de a análise no UV-Vis ser realizada somente em 475 nm, a presença do fármaco foi verificada fazendo-se uma varredura na região de 350 a 700 nm.

Para que fosse possível relacionar a absorbância das amostras em 475 nm com a concentração do fármaco em solução, uma curva de calibração da rifampicina em THF foi construída. Além disso, para verificar se os demais reagentes (iniciador e agente de transferência de cadeia) teriam influência nos valores de absorbância obtidos, as reações sumarizadas na Tabela 2 foram realizadas.

Tabela 2 - Avaliação da influência dos reagentes nos valores de absorvância.

Reações	Fármaco	Iniciador <sup>1</sup>	Agente de transferência de cadeia <sup>2</sup>
5	x	✓	x
6	x	x	✓

✓: Reagente utilizado na respectiva reação modelo

x: Reagente não utilizado na respectiva reação modelo

<sup>1</sup>O iniciador utilizado na reação de polimerização é o azobisisobutironitrila (AIBN)

<sup>2</sup>O agente de transferência de cadeia utilizado foi o 2-ciano-2-propil dodecil tritiocarbonato (CPDT)

Fonte: Autora.

Essas reações também foram realizadas em triplicata, sendo o iniciador e o agente de transferência submetidos, isoladamente, às mesmas condições reacionais citadas (70 °C durante 6h em atmosfera inerte), sem a presença do fármaco. A quantidade utilizada desses reagentes foi a mesma, também tendo sido utilizado 5 mL de THF para a reação. As alíquotas foram retiradas de 2 em 2h e analisadas da mesma forma descrita anteriormente.

Todas as análises de UV-Vis descritas nessa seção foram realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50, utilizando-se cubetas de quartzo padrão.

## 4.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Para a síntese das nanopartículas, a polimerização RAFT em miniemulsão foi utilizada, e as reações foram conduzidas de duas maneiras distintas, tanto com o uso de surfactantes, quanto reações do tipo *surfactant-free* (sem o uso de surfactantes). Inicialmente, preparou-se uma solução aquosa, cuja composição variou de acordo com o agente de transferência de cadeia utilizado: no caso do ácido 4-ciano-4-[(dodecil-sulfaniltiocarbonil)sulfanil] pentanóico) (CPDA), a solução aquosa é de NaOH; se o agente é o 2-ciano-2-propil dodecil tritiocarbonato (CPDT), utiliza-se na solução aquosa o lauril sulfato de sódio (SLS) como surfactante.

Separadamente, a solução orgânica composta pelos monômeros metacrilatos de metila (MMA) e de butila (BMA) foi preparada. Junto destes, adicionou-se hexadecano, azobisisobutironitrila (AIBN), e o agente RAFT (CPDA OU CPDT),

conduzindo a reação com ou sem o fármaco (rifampicina). Realizou-se então uma pré-mistura entre a fase aquosa e orgânica que em seguida, foi ultrassonificada por 2 min (30%,  $T < 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) usando um Sonificador Digital Brason 450 equipado com uma microponeta. Purgou-se nitrogênio na miniemulsão resultante por 30 min e a reação foi conduzida no reator automatizado *EasyMax 102* (Mettler-Toledo), na temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para essas sínteses, a massa da fase aquosa foi de 22 g, e as proporções entre os reagentes utilizados, dependendo do tipo de polimerização utilizada, foram as seguintes:  $[M]/[ATC] = 180$ ,  $[NaOH]/[ATC] \geq 6$ ,  $[ATC]/[I] \geq 2$ ,  $[F] = 1\%$  da fase orgânica. Sendo “M” a quantidade total de monômero, “ATC” o Agente de Transferência de Cadeia, “I” o iniciador e “F” o fármaco, quando aplicável.

#### 4.2.1 Caracterização das nanopartículas poliméricas

O látex obtido ao final da reação foi analisado através de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinação do diâmetro da partícula, por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) para determinação da massa molar, por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para determinação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$  RMN) para confirmação da proporção molar entre os monômeros.

a) DLS: As análises de espalhamento de luz foram realizadas diluindo uma pequena quantidade do látex final (20-100  $\mu\text{L}$ ) em água destilada, em temperatura ambiente, usando o instrumento de medição da Brookhaven Instruments ou o equipamento Zetasizer da Malvern.

b) SEC: Para as análises de cromatografia de exclusão de tamanho as nanopartículas foram previamente isoladas por liofilização. As análises foram realizadas em tetrahidrofurano (THF) a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  e uma taxa de fluxo de 1 mL/min usando um sistema Viscotek composto por um módulo GPCmax VE-2001 (bomba, degaseificador e autoinjeter) e um forno/unidade multidetector TDA-302. O sistema foi equipado com uma coluna de proteção KF-G seguida por quatro colunas Shodex da série KF (806M, 805L, 804L e 803L). Médias de massa molar ( $M_n$  e  $M_w$ ) e distribuições de massa molar ( $\bar{D} = M_w/M_n$ ) foram calculados usando o sinal do índice de refração (RI) e uma curva de calibração baseada em padrões estreitos de poliestireno variando de  $0,5$  a  $4 \times 10^6$  g/mol.

c) DSC: Para essas análises foram necessárias cerca de 6 mg de amostra seca, armazenadas em panela hermética. As análises foram realizadas de -70 a 180 °C a uma taxa de 20 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) usando um equipamento DSC Q20 (TA Instruments). O ciclo de aquecimento-resfriamento foi realizado duas vezes, e a segunda varredura foi utilizada para calcular os valores de temperatura de transição.

d) <sup>1</sup>H RMN: Cerca de 10 mg das amostras previamente liofilizadas foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e as medições foram realizadas em um espectrômetro Bruker 400 MHz.

### 4.3 EXTRAÇÃO DO FÁRMACO

Com o objetivo de avaliar o quanto de fármaco foi encapsulado nas nanopartículas, amostras secas contendo o fármaco foram solubilizadas em tetraidrofurano (THF). A solução resultante teve sua absorbância determinada por espectroscopia UV-Vis em 475 nm, com a mesma instrumentação descrita anteriormente, e a quantidade de fármaco determinada de acordo com a curva de calibração no solvente utilizado.

### 4.4 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

Para traçar o perfil de liberação do fármaco com o decorrer do tempo, as nanopartículas sintetizadas foram isoladas por liofilização do látice final. A uma quantidade de amostra foi adicionado tampão fosfato pH 7,4 e a solução resultante levada para um agitador orbital a 37 °C. Após intervalos de tempo pré-determinados, a solução foi centrifugada e o sobrenadante filtrado utilizando-se uma membrana de nylon de 0,22 µm. Esse filtrado foi então analisado em um espectrofotômetro UV-Vis em 475 nm e a concentração de fármaco liberada para a solução calculada em relação a uma curva padrão construída com o fármaco Rifampicina. A seguir, o tampão era novamente adicionado à amostra e o procedimento repetido. As análises UV-Vis também foram realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 usando cubetas de quartzo padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO

A rifampicina está presente durante toda a polimerização, sendo adicionada juntamente com os outros reagentes no início da reação de síntese das nanopartículas. Sendo assim, por ser submetida às condições reacionais e pela constatação do baixo perfil de liberação obtido anteriormente, a primeira suspeita levantada foi de que o fármaco estava sendo degradado ou consumido pelos radicais livres.

Se essa suspeita de degradação se confirmasse, o baixo perfil de liberação poderia ser explicado, não pelo fato de as nanopartículas não liberarem o fármaco adequadamente, mas por não ser possível detectar a quantidade correta de fármaco liberada devido à sua degradação durante a reação.

Para a investigação da suspeita de degradação do fármaco, uma série de reações modelo foi realizada conforme apresentado anteriormente na Tabela 1. O objetivo dessas reações foi o de verificar o comportamento do fármaco frente a cada um dos reagentes necessários para a síntese das nanopartículas e frente às condições reacionais utilizadas. Como o objetivo não era realizar a polimerização propriamente dita, avaliando-se somente a interação do fármaco com os reagentes, os monômeros não foram incluídos nos testes.

Para que fosse possível detectar o fármaco presente no meio reacional em função do tempo de reação, verificando a ocorrência ou não de degradação, amostras foram retiradas de 2 em 2h e analisadas através de espectroscopia UV-Vis. A presença do fármaco pôde ser confirmada porque a rifampicina apresenta um espectro de absorção na região UV-Visível característico, possuindo um máximo de absorção no comprimento de onda de aproximadamente 475 nm,<sup>38,39,40</sup> sem interferência dos demais componentes da reação.

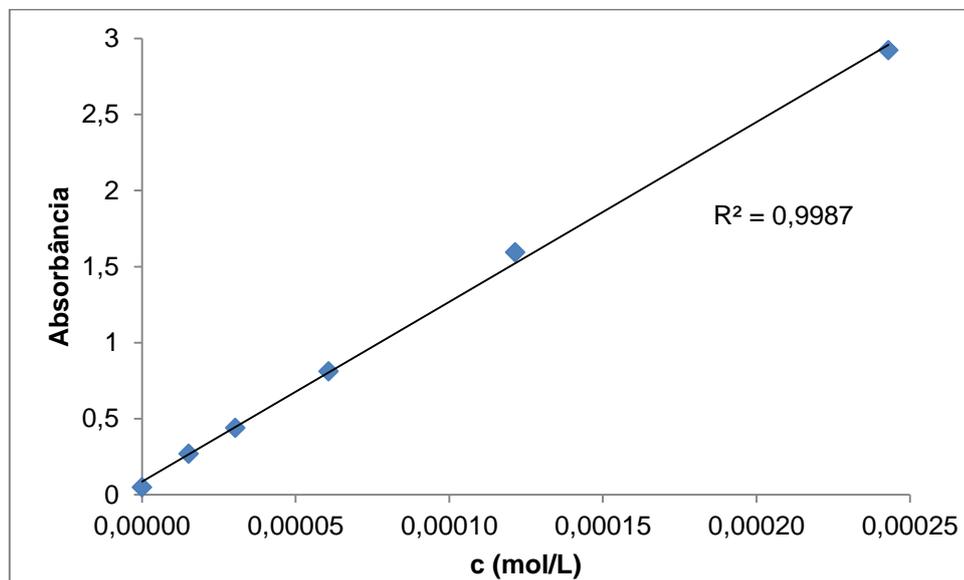
A relação entre a concentração de uma substância presente em uma amostra e a absorbância é dada pela lei de Lambert-Beer, representada pela Equação 1.

$$A = \epsilon l c \quad (1)$$

Sendo  $A$  a absorvância,  $\epsilon$  a absorvidade molar, valor intrínseco de cada substância,  $l$  o comprimento da célula por onde passou o feixe irradiado e  $c$  a concentração, tendo-se, portanto, uma relação diretamente proporcional entre a absorvância e a concentração.

A curva de calibração de rifampicina em THF foi construída antes da realização das reações modelo para confirmar a linearidade existente entre a concentração do fármaco e a absorvância medida, em 475 nm. O Gráfico 7, representado abaixo, demonstra a curva de calibração construída.

Gráfico 7 - Curva de calibração da Rifampicina em THF.

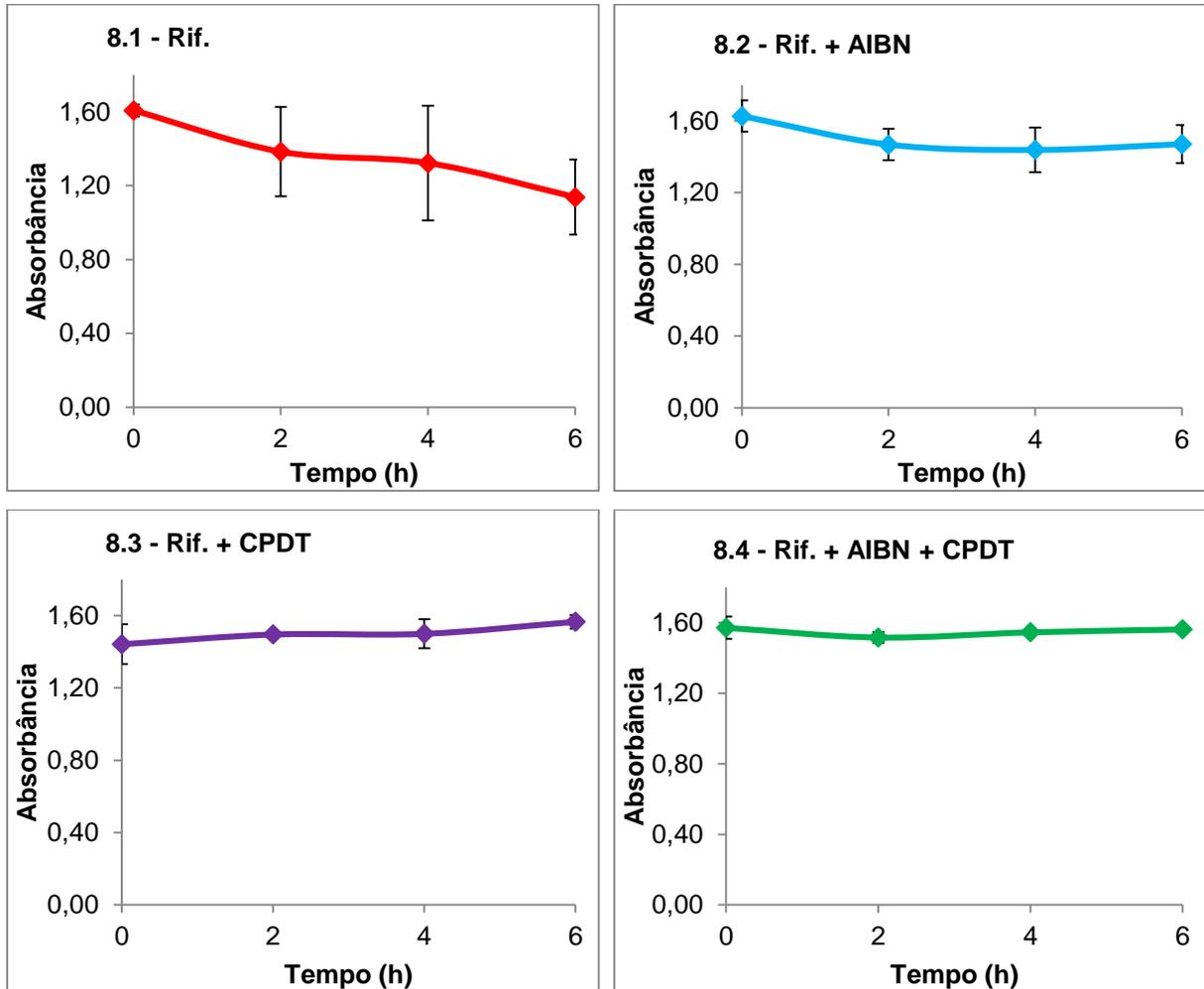


Fonte: Autora.

Pelo valor de  $R^2$  obtido, a linearidade existente entre a concentração de rifampicina no meio e a absorvância da amostra analisada foi confirmada. Finalmente, após essa confirmação, as reações modelo da Tabela 1 foram realizadas e as alíquotas analisadas no UV-Vis em 475 nm. Conforme descrito, as alíquotas retiradas durante as reações foram diluídas em THF para serem analisadas. Essa diluição foi necessária para que a concentração do fármaco ficasse dentro da faixa da curva de calibração construída.

Os resultados obtidos estão representados pelos Gráficos 8.1 – 4, sendo construídos considerando-se a média dos resultados para as triplicatas. Além disso, o desvio padrão resultante foi reproduzido.

Gráfico 8 - Diagrama de estabilidade do fármaco isoladamente (1), na presença do iniciador (2), na presença do agente de transferência de cadeia (3) e na presença de ambos (4).



┆ : Desvio padrão; Rif.: Rifampicina.

Fonte: Autora.

Conforme discutido, os ensaios realizados com as reações modelo nos permitem inferir acerca da estabilidade do fármaco. Sendo assim, uma análise crítica de cada um dos resultados obtidos é necessária.

O diagrama 8.1 corresponde aos resultados obtidos para a reação 1 da Tabela 1 e é possível observar uma queda considerável no valor da absorbância com o tempo de reação. Isso indica que a rifampicina, quando submetida isoladamente às condições reacionais da polimerização, ou seja, sem a presença de qualquer outro reagente no meio, sofre degradação. A hipótese levantada é de que, com o aquecimento, a rifampicina gera radicais livres que vão degradando as próprias moléculas de fármaco com o tempo de reação, o que explica o

comportamento observado. Através do desvio padrão representado, observa-se uma grande variabilidade entre as triplicatas em termos dessa degradação, indicando que não ocorre de igual maneira entre as reações. Entretanto, apesar de a degradação do fármaco não ter ocorrido de modo equivalente entre as triplicatas, é incontestável que ela ocorre.

O diagrama 8.2 refere-se a reação 2 da Tabela 1 e observa-se uma alteração no perfil de degradação do fármaco. Apesar de a absorvência apresentar uma queda ao longo do tempo de reação, essa diminuição foi muito menos acentuada, indicando um menor grau de degradação do fármaco. Acontece que, conforme hipótese levantada anteriormente, devido ao aquecimento a rifampicina gera radicais livres em sua estrutura. Esses radicais livres gerados podem se combinar com os radicais livres formados pelo AIBN, que é o iniciador radicalar térmico utilizado na reação de polimerização. Essa combinação entre os radicais gerados no meio impede que a rifampicina continue se degradando ao longo da reação, o que explica a queda menos acentuada da absorvência em relação ao diagrama 8.1. Quanto ao desvio padrão, também nota-se uma diferença considerável em relação à reação anterior. Apesar de ainda termos uma variação entre as triplicatas, essa variabilidade apresentada é muito menos evidente.

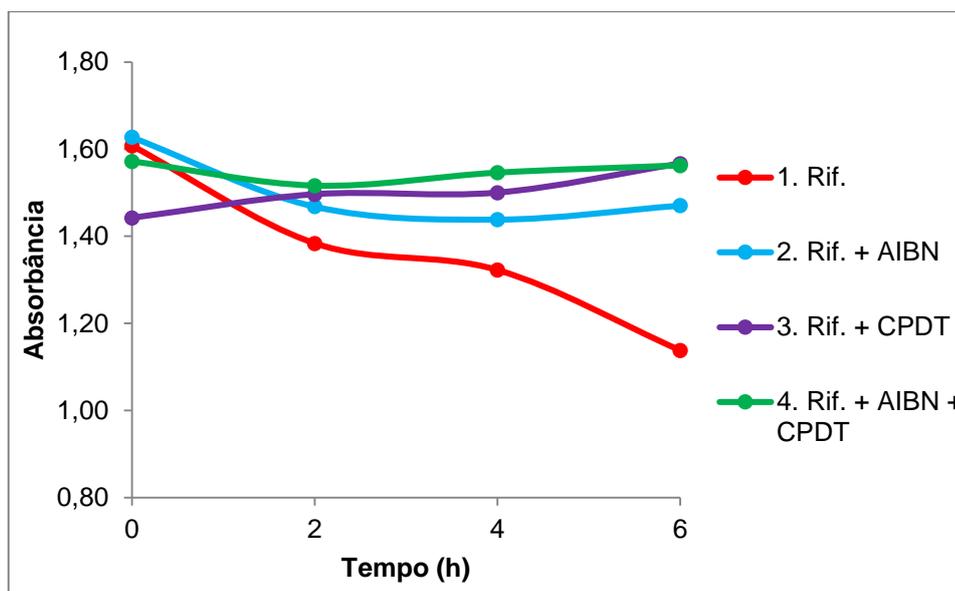
O diagrama 8.3 representa os resultados obtidos para a reação da rifampicina com o agente de transferência de cadeia, e é possível observar que praticamente não houve degradação do fármaco. Ao contrário dos resultados obtidos até agora, nessa reação, a absorvência praticamente não variou ao longo do tempo, indicando que a rifampicina permanece estável nesse meio reacional. Provavelmente, isso se deve à alta reatividade da dupla ligação do agente de transferência de cadeia (C=S). Se a rifampicina formar algum radical livre em sua estrutura no meio reacional devido ao aquecimento, este prontamente será capturado pelo agente RAFT, impedindo que a degradação do fármaco continue, o que explica o comportamento observado. Além disso, o desvio padrão obtido para as triplicatas da reação foi muito baixo, sendo o maior deles no tempo zero, o que se deve, provavelmente, a uma pequena diferença em relação à massa de rifampicina pesada inicialmente.

Por fim, com o diagrama 8.4 pode-se entender qual é o comportamento real da rifampicina frente às condições reacionais completa da polimerização, ou seja,

em que todos os reagentes estão presentes no meio. Podemos observar que dentre todos os outros resultados obtidos, esse foi o que o valor de absorvância menos variou com o tempo de reação, se mantendo praticamente constante em todas as alíquotas analisadas. Além disso, o desvio padrão obtido para as triplicatas foi extremamente baixo, sendo praticamente imperceptível no diagrama, indicando que o comportamento apresentado pelo fármaco é praticamente invariável de uma reação para a outra. Com isso, podemos inferir que nessas condições, o radical livre formado pela decomposição do iniciador reage preferencialmente com o agente de transferência de cadeia, preservando assim, a estrutura da rifampicina, que permanece estável durante toda a reação de polimerização, não sofrendo, portanto, degradação no meio reacional.

Para melhor visualização dos pontos aqui discutidos, o Gráfico 9, representado abaixo, sintetiza os resultados obtidos para todas as reações.

Gráfico 9 - Diagrama completo de estabilidade do fármaco.



Fonte: Autora.

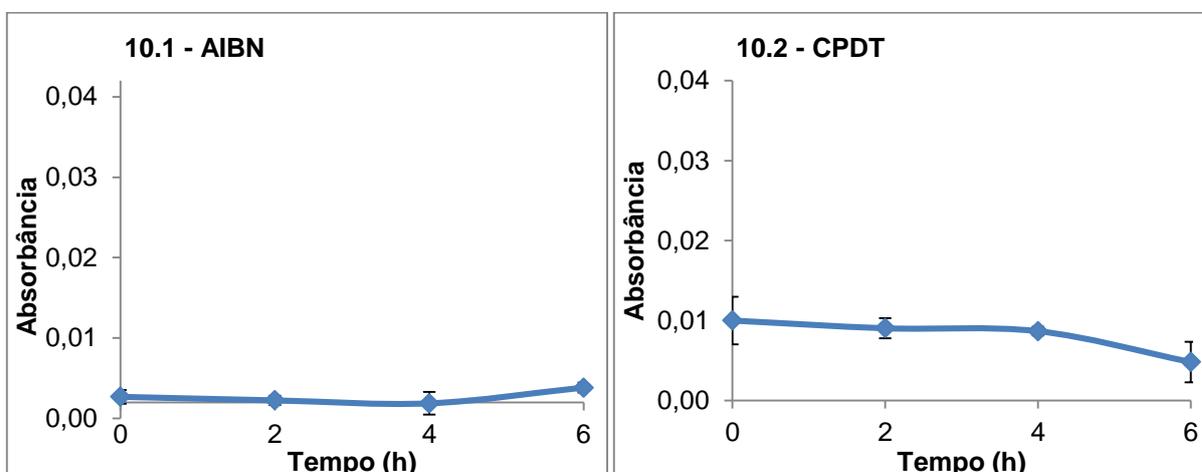
A visualização de todas as curvas sobrepostas reforça, ainda mais, a conclusão de que a rifampicina permanece estável durante toda a reação de polimerização, quando todos os reagentes estão presentes no meio reacional (resultado expresso pela linha verde no Gráfico 9).

Para confirmar a confiabilidade dos resultados obtidos, mais uma verificação foi realizada. A rifampicina absorve na região do UV-Vis, tendo um máximo de

absorção no comprimento de onda utilizado nas análises (475 nm). Porém, como afirmar que nas reações em que outros reagentes estavam presentes nas alíquotas analisadas (reações 2, 3 e 4 da Tabela 1), a absorbância medida provinha somente da concentração de rifampicina presente no meio?

Para descartar a interferência dos demais reagentes nos resultados obtidos, estes foram submetidos às reações sumarizadas na Tabela 2. Agora, sem a presença do fármaco, os reagentes isoladamente passaram pelos testes para simular as condições reacionais utilizadas durante a polimerização (70 °C durante 6h em atmosfera inerte), utilizando-se THF como solvente. Da mesma forma, as alíquotas retiradas de 2 em 2h foram analisadas em 475 nm, sendo possível verificar se os reagentes também absorvem nessa região, o que influenciaria nos resultados obtidos anteriormente para as reações modelo. Os resultados obtidos encontram-se expressos no Gráfico 10.

Gráfico 10 - Verificação da influência do AIBN (1) e do CPDT (2) nas absorbâncias obtidas em 475 nm.



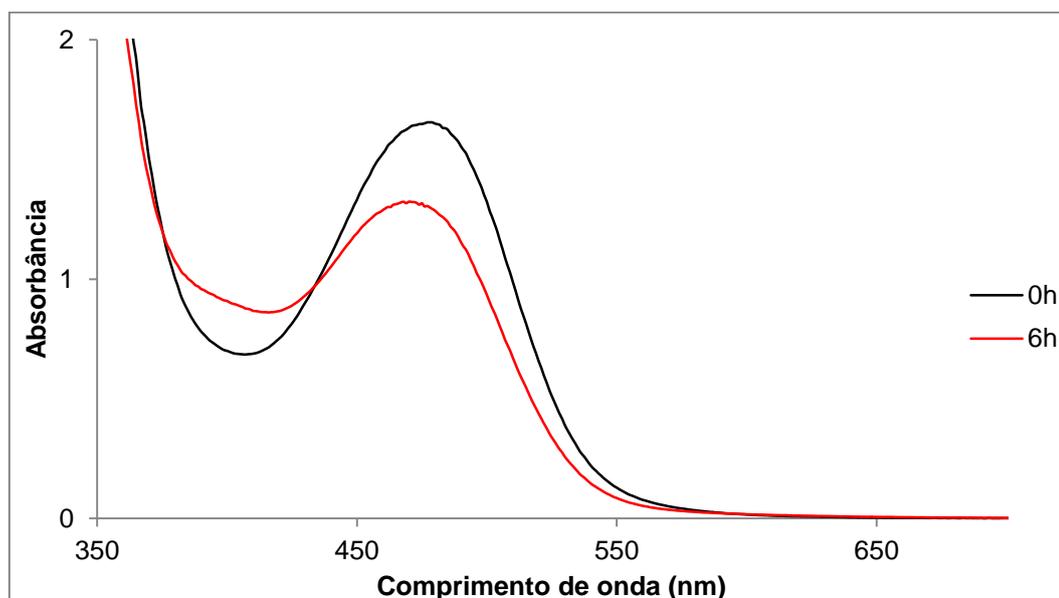
Fonte: Autora.

Com os resultados expressos pelo Gráfico 10, é possível verificar que os valores de absorbância medidos, tanto para o AIBN (10.1) quanto para o CPDT (10.2) são muito próximos de zero em todo o tempo de reação. Esses valores representam menos de 1% dos valores de absorbância obtidos para as reações modelo, sendo, portanto, insignificantes. Com isso, concluímos que os reagentes não influenciam nas leituras de absorbância obtidas para as reações modelo, indicando que os resultados encontrados referem-se somente a concentração de

rifampicina presente no meio reacional, indicando, portanto, sua degradação e/ou estabilidade, conforme discutido anteriormente.

Para certificar a estabilidade do fármaco, a reação 4 da Tabela 1 foi repetida (em que o fármaco foi submetido às condições reacionais da polimerização na presença de todos os reagentes), e ao invés de avaliar as alíquotas em somente um comprimento de onda específico, foi feita uma varredura de 350 a 700 nm, obtendo-se assim, um espectro de absorbância da rifampicina. Para esta análise, duas alíquotas foram retiradas, uma no início e outra no final da reação, para comparar os espectros obtidos (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Espectro de absorção do fármaco rifampicina antes e depois de submetido às condições reacionais.

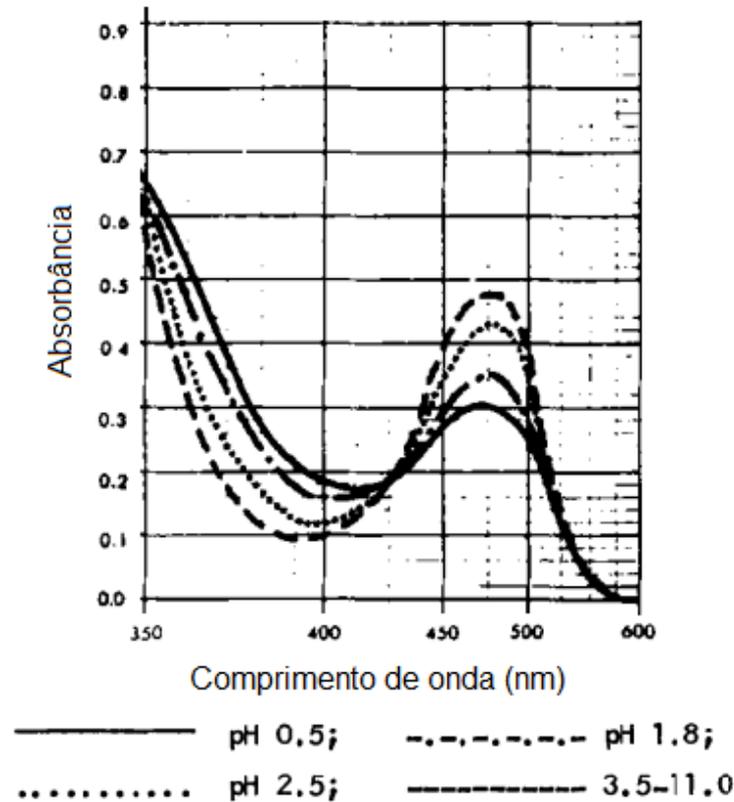


Fonte: Autora.

Os espectros inicial e final da rifampicina na presença de AIBN e CPDT são semelhantes, ocorrendo apenas uma pequena variação na absorbância. Inicialmente, acreditávamos que essa variação poderia estar sendo ocasionada por uma diferença de concentração do fármaco nas alíquotas analisadas. Entretanto, a variação na absorbância não segue o mesmo perfil: um pouco antes de 450 nm, é possível observar uma inversão no comportamento das amostras.

De acordo com a literatura, há uma variação característica no espectro UV-Vis da rifampicina com o pH,<sup>40</sup> que pode ser observado através da Figura 5.

Figura 5 - Variação do espectro UV-Vis da rifampicina com o pH.



Fonte: GALLO, Gian G., 1976.<sup>40</sup>

Segundo relatado, em particular, o máximo de absorbância sofre um efeito hipocrômico (diminuição da intensidade) com ácidos fortes, que é ocasionado pela presença do grupo hidroxila ligado ao anel aromático adjacente à hidroquinona na estrutura da rifampicina, representada pela Figura 1.

Comparando os espectros obtidos e o da literatura, é possível verificar a semelhança existente entre os comportamentos observados. Isso sugere que uma mudança no pH do meio reacional foi a responsável pela variação da absorbância entre as alíquotas inicial e final.

Sendo assim, os resultados obtidos confirmam a conclusão anterior, de que o fármaco não está sendo degradado no meio reacional.

## 5.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Depois de confirmar que o fármaco se mantém estável nas condições reacionais da polimerização RAFT em miniemulsão, foi excluída a hipótese de o baixo perfil de liberação estar associado à degradação no meio reacional, o que

ocasionaria uma queda na absorbância, fazendo com que os resultados de liberação obtidos estivessem abaixo do esperado. Sendo assim, outra investigação acerca do baixo perfil de liberação foi realizada, conforme descrito a seguir.

As nanopartículas obtidas e caracterizadas anteriormente eram sintetizadas com os comonômeros MMA e BMA na proporção molar 40:60 (MMA:BMA), sendo o copolímero obtido através da polimerização RAFT em miniemulsão, e as reações conduzidas tanto com o uso de surfactantes, quanto sem surfactante (*surfactant-free*). As análises de DSC realizadas revelaram que a temperatura de transição vítrea desse copolímero era em torno de 50 °C. Considerando esse valor de  $T_g$ , surgiu outra hipótese do que poderia estar ocasionando o baixo perfil de liberação do fármaco: ao invés de estar sendo degradado no meio reacional, sua liberação poderia estar sendo dificultada pela rigidez das nanopartículas poliméricas ( $T_g > 37^\circ\text{C}$ ).

A temperatura de transição vítrea consiste na passagem do estado vítreo, onde as cadeias poliméricas encontram-se vitrificadas, sendo rígidas e não possuindo mobilidade, para o estado elástico, em que há um aumento da mobilidade, fazendo com que se tornem mais flexíveis.

Dito isto, como a liberação do fármaco a partir das NP é realizada a 37 °C para simular a temperatura corpórea, e o copolímero sintetizado anteriormente apresenta uma  $T_g$  acima desse valor, nessa temperatura não seria maleável o suficiente para que todo o fármaco encapsulado fosse liberado.

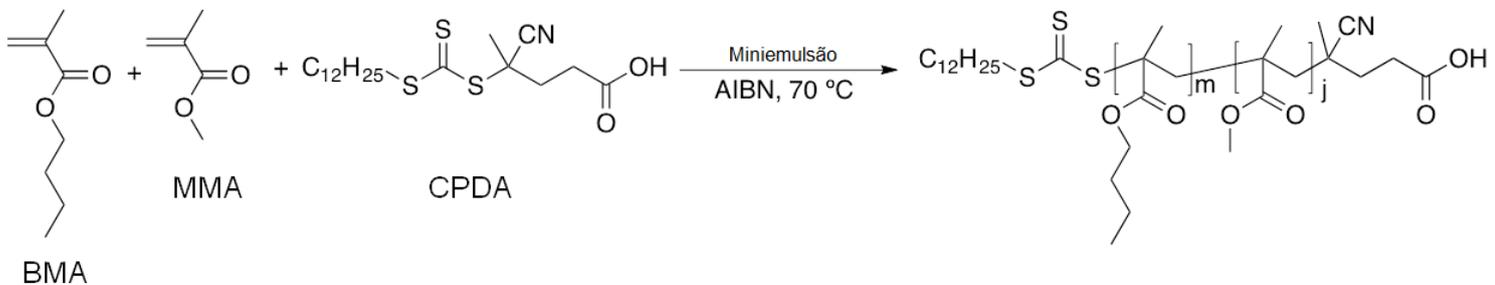
Sendo assim, para resolver esse problema, surgiu a ideia de sintetizar novas nanopartículas poliméricas, da mesma forma que vinham sendo sintetizadas até então, porém, realizando-se alterações que fizessem com que a  $T_g$  do copolímero obtido fosse inferior a 37 °C.

Para que seja possível diminuir o valor de  $T_g$  de um polímero, as cadeias poliméricas devem possuir maior mobilidade. Resolvemos então, alterar a proporção molar entre os monômeros, aumentando a quantidade de BMA (20:80 (MMA:BMA)). Por apresentar um substituinte alquila maior em comparação ao MMA, o BMA atuaria como um espaçador, aumentando o volume livre entre as cadeias

poliméricas, conseqüentemente aumentando a mobilidade destas e diminuindo o valor da  $T_g$ .

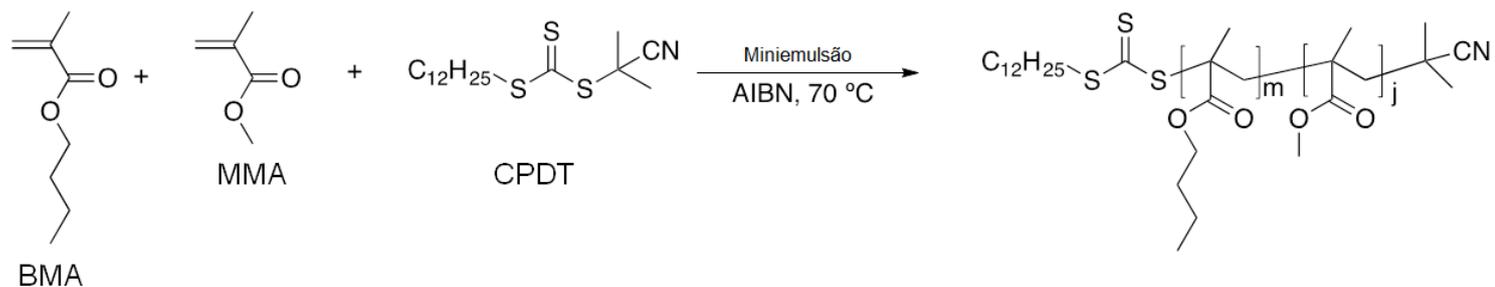
Os Esquemas 2 e 3, representados abaixo, demonstram a reação de síntese das nanopartículas, variando o agente RAFT utilizado, e a Tabela 3 sumariza os dados referentes às sínteses realizadas com a proporção molar 20:80 (MMA:BMA), bem como os resultados obtidos. Para fins de comparação, também foi realizada uma reação na proporção molar utilizada anteriormente (40:60), e os resultados obtidos também encontram-se na Tabela 3.

Esquema 2 - Reação de síntese do copolímero, obtido via polimerização RAFT em miniemulsão, utilizando o CPDA como agente de transferência de cadeia.



Fonte: Autora.

Esquema 3 - Reação de síntese do copolímero, obtido via polimerização RAFT em miniemulsão, utilizando o CPDT como agente de transferência de cadeia.



Fonte: Autora.

Através da Tabela 3, é possível verificar que as primeiras tentativas de síntese das nanopartículas nessa nova proporção molar foram realizadas com condições do tipo *surfactant free* e não foram bem sucedidas, obtendo-se baixas conversões (reações 1 e 2). Entretanto nas reações com SLS e CPDT a formação do copolímero ocorreu com bons rendimentos (reações 3,4 e 5).

A reação realizada na proporção molar 40:60 (reação 6) foi bem sucedida mesmo sem a presença de surfactante (*surfactant free*), resultado que já havia sido constatado anteriormente.

Sendo assim, podemos concluir que nas reações com a proporção molar 20:80, o surfactante tem um papel muito importante na estabilização das partículas formadas durante a polimerização, e os resultados obtidos nos sugere que a presença de maior quantidade de metacrilato de butila leva a maior coalescência das gotas e menor estabilidade da emulsão.

Tabela 3 - Sínteses e caracterização das nanopartículas poliméricas na proporção molar 20:80 (MMA:BMA) obtidas via polimerização RAFT em miniemulsão.

#	Surfactante	RAFT	Fármaco	t (h)	Conv. (%)	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	d (nm)	PDI
1	<i>free</i>	CPDA	Sim	6	4	1840	1,37	-	-
2	<i>free</i>	CPDA	Sim	6	2	1390	1,43	-	-
3	SLS	CPDT	Não	24	74	17200	1,61	200,1	0,079
4	1,5 x SLS	CPDT	Não	24	59	17100	1,22	198,6	0,022
5	SLS	CPDT	Sim	24	77	21200	1,26	259,7	0,034
6*	<i>free</i>	CPDA	Sim	6	54	11700	1,15	94,3	0,037

\*A reação 6 foi realizada na proporção molar 40:60 (MMA:BMA) para fins de comparação.

Conv.: Conversão

Fonte: Autora.

Através da Tabela 3 também é possível verificar que a massa molar numérica média (M<sub>n</sub>) das nanopartículas sintetizadas com a nova proporção molar (reações 3,4 e 5) foram parecidas, bem como os valores de dispersidade (M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> e PDI) e o diâmetro médio (d) das partículas obtidas.

Para avaliarmos o impacto da alteração da proporção molar nas propriedades das NP, as sínteses representadas pelas reações 5 e 6 da Tabela 3 foram analisadas. Essas reações foram escolhidas por terem sido sintetizadas com altas conversões, e ambas na presença do fármaco rifampicina.

### 5.2.1 Massa molar

Comparando as NP provenientes das reações mencionadas, obtidas a partir de polimerizações realizadas com proporções molares distintas entre os monômeros, é possível observar que não apresentam uma diferença significativa em relação à massa molar.

As NP sintetizadas com a maior proporção de BMA apresentaram um maior valor de  $M_n$ . Acontece que, o BMA possui uma massa molar maior em comparação ao MMA, sendo assim, ao aumentarmos a quantidade de BMA, aumentando consequentemente o número de unidades repetitivas provenientes desse monômero na cadeia polimérica, a massa molar do polímero também aumentaria.

Além disso, ambas as reações apresentaram valores baixos de dispersidade ( $M_w/M_n$ ). Esse controle em relação à massa molar das nanopartículas é consistente com o esperado para uma polimerização radicalar controlada, e conforme discutido anteriormente, essa uniformidade das nanopartículas sintetizadas é importante para que a liberação do fármaco ocorra de modo equivalente entre as partículas.

### 5.2.2 Tamanho de partícula

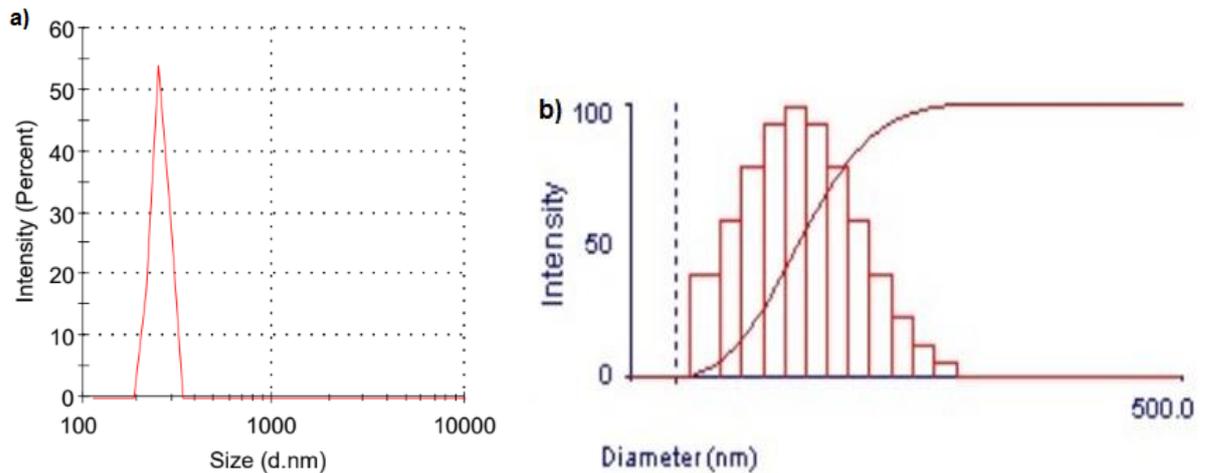
A Figura 6a-b mostra os resultados de tamanho de partícula obtidos para as reações 5 e 6, respectivamente. Apesar de ambos os diâmetros terem sido determinados por espalhamento de luz dinâmico, foram realizadas em equipamentos diferentes, por isso é possível notar uma diferença em relação à representação das análises obtidas.

Considerando-se os valores de diâmetro das partículas (d) fornecidos pela Tabela 3 e representados pela Figura 6, é possível notar uma grande diferença. As nanopartículas sintetizadas com a proporção molar 40:60 apresentaram um diâmetro médio de 94 nm, enquanto que para as partículas sintetizadas na proporção 20:80, esse valor mais que dobrou.

O aumento do diâmetro dessas nanopartículas em comparação com as anteriores também está dentro do esperado, considerando que aumentamos a quantidade de BMA. Como a função desse monômero é de promover um maior volume livre entre as cadeias poliméricas, aumentando a mobilidade dessas e

diminuindo o valor da  $T_g$ , também é de se esperar que esse efeito ocasione um aumento do diâmetro médio das partículas formadas.

Figura 6 - Resultados espalhamento de luz para as nanopartículas referentes às reações 5 (a) e 6 (b).



Fonte: Autora.

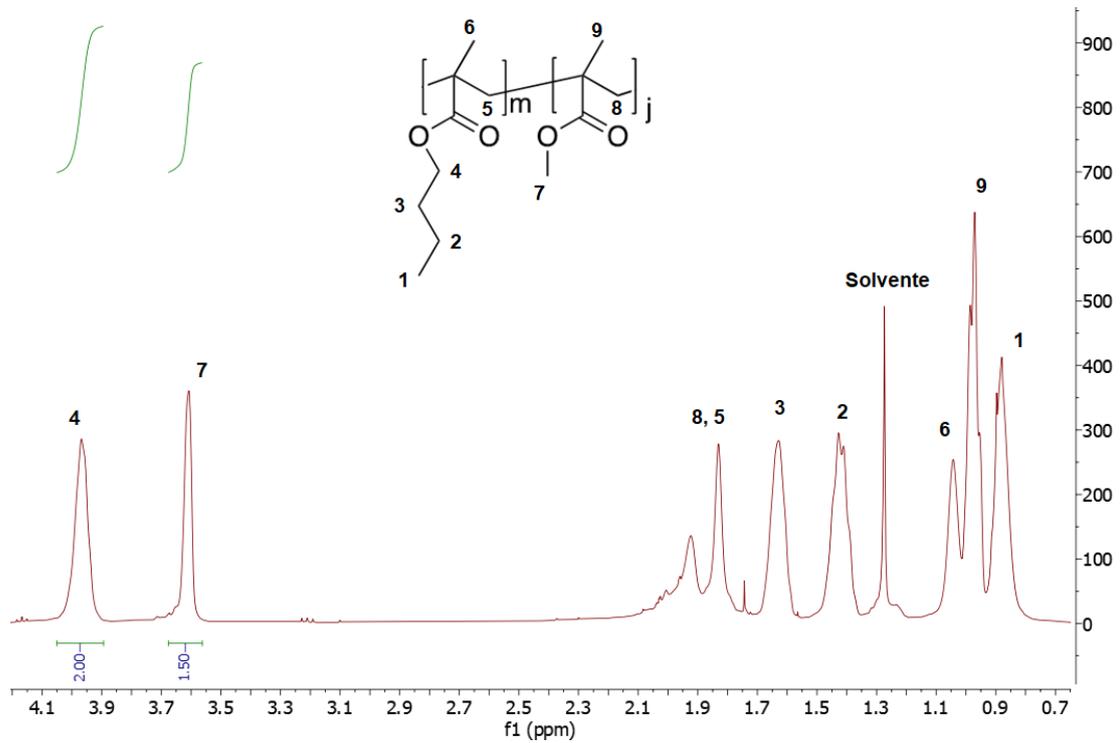
Em relação aos valores do índice de polidispersão (PDI), dados pela Tabela 3, podemos verificar que ambas as reações apresentaram valores muito baixos, o que, novamente, indica um alto grau de homogeneidade das NP sintetizadas, característica importante para a aplicação proposta.

### 5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

A análise de RMN  $^1\text{H}$  foi realizada para confirmar a obtenção dos copolímeros, bem como a proporção molar existente entre os monômeros efetivamente incorporados. As Figuras 7 e 8 representam os espectros obtidos para os copolímeros sintetizados com proporção molar 40:60 e 20:80 (MMA:BMA), respectivamente.

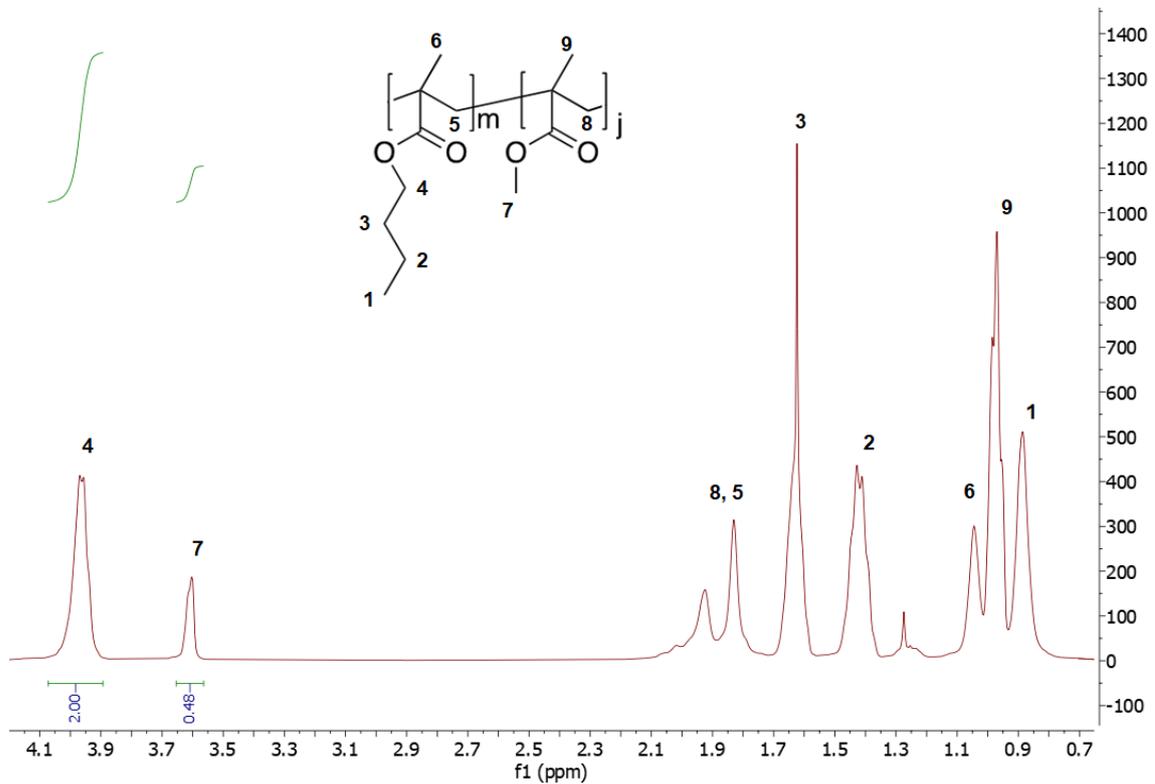
Através das figuras é possível observar a semelhança existente entre os espectros obtidos, e a atribuição para os picos confirma a obtenção do copolímero em ambas as sínteses realizadas.

Figura 7 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) para o copolímero sintetizado com proporção molar 40:60.



Fonte: Autora.

Figura 8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) para o copolímero sintetizado com proporção molar 20:80.



Fonte: Autora.

O cálculo de proporção pode ser realizado considerando-se a integral de hidrogênios referentes a cada comonômero. Os sinais utilizados foram os hidrogênios representados por “7” e “4”, referentes ao MMA e ao BMA, respectivamente, conforme evidenciado pelas Figuras 7 e 8. Considerando-se os valores de integrais obtidos, os cálculos realizados estão representados a seguir.

- Para a proporção teórica 40:60, tem-se:

$$4 \text{ ppm} \rightarrow \frac{\int 2}{2H} = 1 \text{ (BMA)} \quad (2)$$

$$3,6 \text{ ppm} \rightarrow \frac{\int 1,5}{3H} = 0,5 \text{ (MMA)} \quad (3)$$

$$\text{Proporção (BMA)} = \frac{1}{1+0,5} \times 100 = 66,7\% \quad (4)$$

- Para a proporção teórica 20:80, tem-se:

$$4 \text{ ppm} \rightarrow \frac{\int 2}{2H} = 1 \text{ (BMA)} \quad (5)$$

$$3,6 \text{ ppm} \rightarrow \frac{\int 0,48}{3H} = 0,16 \text{ (MMA)} \quad (6)$$

$$\text{Proporção (BMA)} = \frac{1}{1+0,16} \times 100 = 86,2\% \quad (7)$$

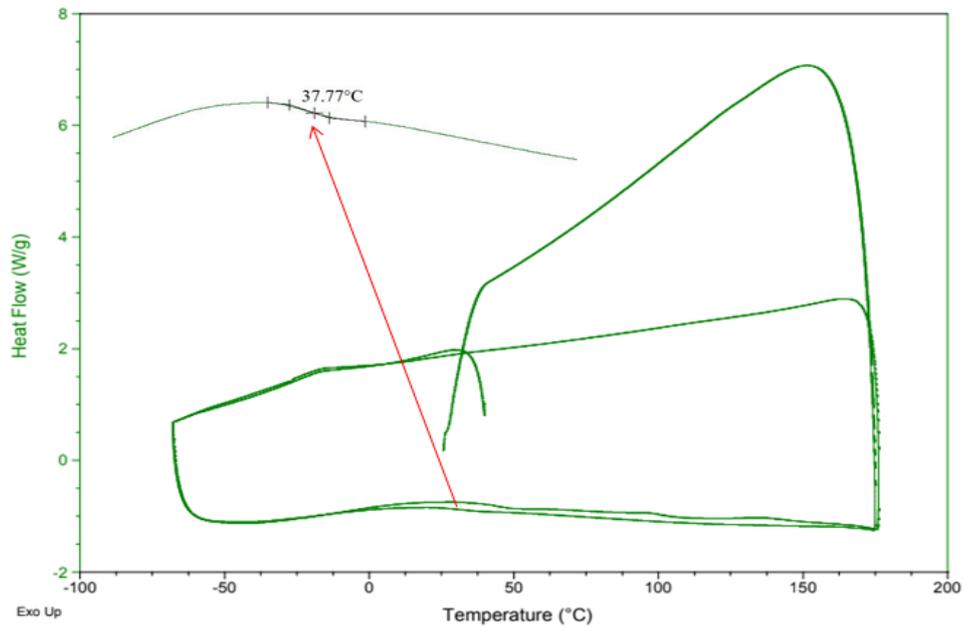
Com os cálculos realizados é possível verificar que para ambos os copolímeros sintetizados a proporção molar existente entre os comonômeros ficou próximo do valor teórico. Além disso, o comportamento para ambas as sínteses foi o mesmo, em que a quantidade incorporada de BMA ficou pouco acima do previsto.

#### 5.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial

As Figuras 9 e 10 mostram as curvas de aquecimento e resfriamento das amostras das reações de proporção molar 40:60 e 20:80, respectivamente.

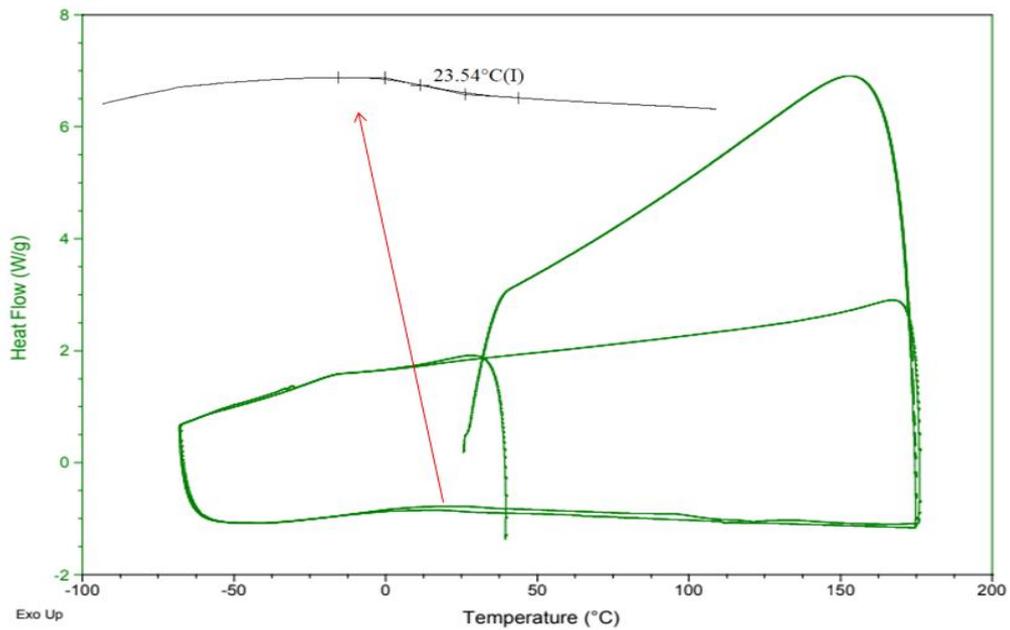
As curvas de DSC são sensíveis a qualquer tipo de transição das amostras, seja por liberação ou absorção de calor. Nas curvas representadas, obtidas para os copolímeros, é possível verificar o valor da  $T_g$ , processo que se caracteriza pelo ganho de mobilidade das cadeias poliméricas como um todo, ocorrendo assim, uma variação na linha de base.

Figura 9 - Curva de DSC do copolímero de proporção molar 40:60.



Fonte: Autora.

Figura 10 - Curva de DSC do copolímero de proporção 20:80.



Fonte: Autora.

A Tabela 4, representada abaixo, sumariza os valores obtidos. Através destes, é possível constatar que as nanopartículas de proporção molar 20:80 (MMA:BMA) apresentaram um menor valor de  $T_g$  em comparação às nanopartículas de proporção molar 40:60, confirmando que o aumento da quantidade de metacrilato

de butila no copolímero aumenta a mobilidade das cadeias poliméricas, conforme esperado.

Tabela 4 - Temperatura de transição vítrea dos copolímeros sintetizados.

Tipo de NP	T <sub>g</sub> (°C)
40:60	38
20:80	23

Fonte: Autora.

As nanopartículas de proporção molar 40:60 sintetizadas anteriormente eram mais rígidas, apresentando um valor de T<sub>g</sub> próximo de 50 °C, o que, segundo hipótese levantada, estaria dificultando a liberação do fármaco. Porém, ao sintetizar as nanopartículas nessa mesma proporção molar, o valor de T<sub>g</sub> obtido, conforme representado pela Figura 9 e expresso pela Tabela 4, foi de 38 °C, o que indica que as nanopartículas sintetizadas com essa mesma proporção molar não são tão rígidas quanto esperado. Esse menor valor de T<sub>g</sub> obtido pode ser explicado pelo resultado do cálculo de incorporação, realizado através do espectro de RMN <sup>1</sup>H. Conforme demonstrado pela Equação 4, a proporção efetivamente incorporada de BMA foi maior do que a proporção teórica, e esse aumento pode ter sido responsável pelo menor valor de T<sub>g</sub> para esse copolímero, em comparação ao obtido para as nanopartículas sintetizadas anteriormente.

### 5.3 EXTRAÇÃO DO FÁRMACO

Durante a polimerização, como o fármaco está presente no meio reacional juntamente com os monômeros, idealmente todo o fármaco adicionado deveria ser encapsulado pelas nanopartículas. Entretanto, a eficiência de incorporação pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo, migração do fármaco para a fase aquosa da reação (antes, durante e após a polimerização) e perda de fármaco durante o processo de secagem. Sendo assim, o objetivo do experimento de extração do fármaco é o de avaliar o quanto de fármaco (F) há nas nanopartículas (NP).

Para isso, as NP secas contendo o fármaco foram solubilizadas em THF, e a solução resultante teve sua absorbância determinada por espectroscopia UV-Vis em

475 nm, sendo a quantidade de fármaco determinada de acordo com a curva de calibração construída.

Além disso, para evitar a influência dos outros componentes na absorção em 475 nm, testes em branco foram realizados. Nesses testes, NP sintetizadas sem o fármaco foram solubilizadas e a absorbância residual também foi analisada por UV-Vis em 475 nm. Os resultados obtidos para a reação realizada com proporção 40:60 estão expressos na Tabela 5, e para a proporção 20:80 na Tabela 6.

Tabela 5 - Resultados do teste de extração do fármaco realizado com as NP com proporção 40:60 (MMA:BMA).

Tipo de NP	Massa (mg)	Abs	Abs(corrigida)	C (mg/mL)	F (mg)	F/NP
Branco	6,50	0,0089	-	-	-	-
R1	6,80	0,2640	0,2551	0,0158	0,0789	0,0116
R2	6,80	0,2726	0,2637	0,00163	0,0816	0,0120
R3	6,40	0,2650	0,2561	0,0159	0,0793	0,0124
Média	6,67	0,2672	0,2583	0,0160	0,0799	0,0120
Desvio padrão	0,23	0,0047	0,0047	0,0003	0,0015	0,0004

R = Replicata; Abs = Absorbância; F = Fármaco; F/NP = relação entre a massa de fármaco e a massa de NP.

Fonte: Autora.

Tabela 6 - Resultados do teste de extração do fármaco realizado com as NP com proporção 20:80 (MMA:BMA).

Tipo de NP	Massa (mg)	Abs	Abs(corrigida)	C (mg/mL)	F (mg)	F/NP
Branco	7,10	0,0006	-	-	-	-
R1	6,50	0,0747	0,0741	0,0045	0,0227	0,0035
R2	6,00	0,0681	0,0675	0,0041	0,0207	0,0034
R3	6,10	0,0725	0,0719	0,0044	0,0220	0,0036
Média	6,20	0,0718	0,0712	0,0044	0,0218	0,0035
Desvio padrão	0,26	0,0034	0,0034	0,0002	0,0010	0,0001

R = Replicata; Abs = Absorbância; F = Fármaco; F/NP = relação entre a massa de fármaco e a massa de NP.

Fonte: Autora.

Comparando os valores de F/NP obtidos, podemos verificar que a quantidade de fármaco efetivamente encapsulado pelas NP com proporção molar 20:80 foi menor em comparação às NP de proporção 40:60.

Além disso, sabendo-se a quantidade de fármaco adicionada em cada uma das reações, podemos calcular o valor de F/NP teórico, ou seja, qual seria esse fator se todo o fármaco adicionado tivesse sido incorporado nas NP. Através desse cálculo, podemos ainda, verificar qual a porcentagem de fármaco as NP sintetizadas foram capazes de encapsular. Esses valores encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Teor de fármaco incorporado pelas NP.

Tipo de NP	F/NP (teórico)	F/NP (obtido)	Fármaco incorporado (%)
40:60	0,0149	0,0120	80
20:80	0,0129	0,0035	27

Fonte: Autora.

Conforme evidenciado, o teor de fármaco incorporado pelas NP de proporção molar 20:80 foi muito baixo, e esse resultado se deve ao baixo valor de  $T_g$  desse copolímero ( $\sim 23$  °C). Pelo fato de o copolímero estar no estado elástico à temperatura ambiente, pode haver um processo de difusão simples do fármaco a partir das NP, ocorrendo, portanto, uma movimentação a favor do gradiente de concentração, diminuindo assim, a eficiência de incorporação.

#### 5.4 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

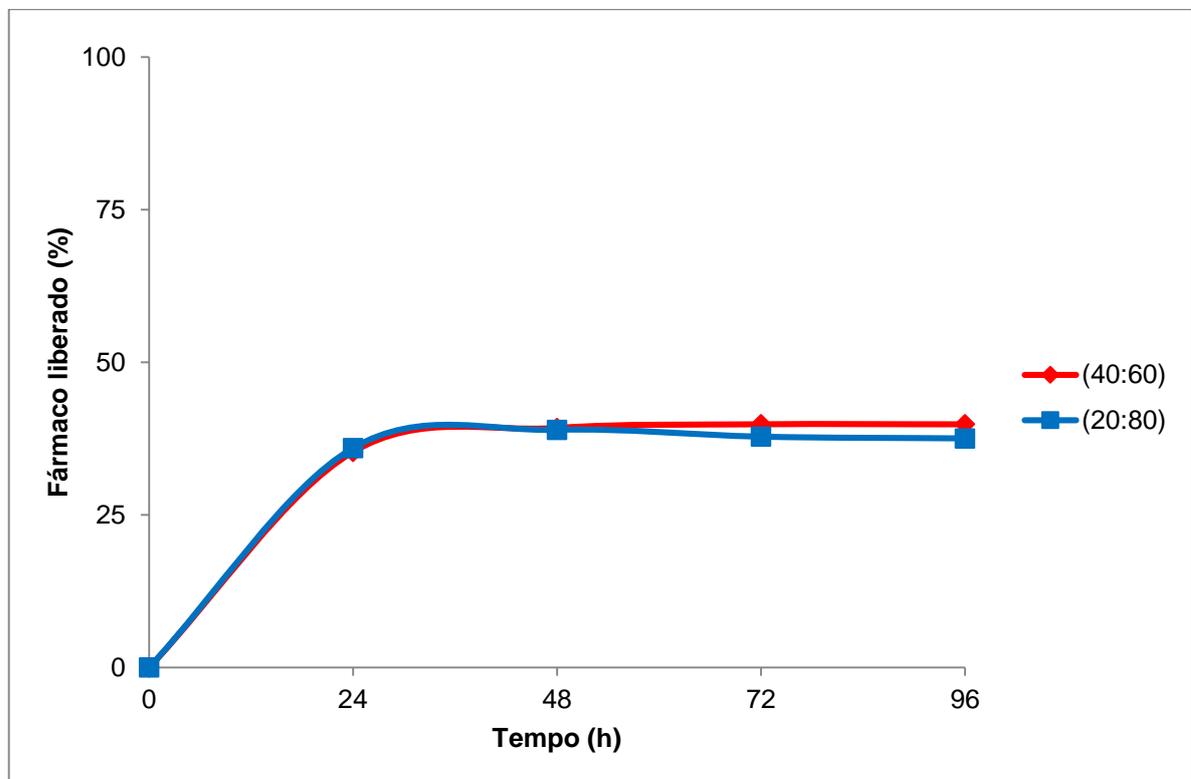
Após realizar as caracterizações das NP sintetizadas com diferentes proporções molares entre os monômeros, o perfil de liberação do fármaco para ambas foi avaliado conforme metodologia descrita. O teste foi realizado a 37 °C para simular a temperatura corpórea e os resultados obtidos para ambas as NP estão representados pelo Gráfico 12.

Conforme preconizado ao longo do trabalho, depois de confirmar que o fármaco não estava sendo degradado no meio reacional, a alteração da proporção molar dos monômeros utilizados para a síntese das NP foi proposta a fim de diminuir a  $T_g$  do copolímero, melhorando assim, o perfil de liberação do fármaco.

Essa proposta foi dada com base nos resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, em que o copolímero sintetizado com proporção molar 40:60 (MMA:BMA) apresentou uma  $T_g$  próxima de 50 °C, o que poderia ser a causa da baixa liberação do fármaco a partir das NP.

Porém, o copolímero que sintetizamos com essa mesma proporção molar apresentou um valor de  $T_g$  de 38 °C, o que sugere que as NP obtidas não são tão rígidas quanto as anteriores, conforme discutido anteriormente.

Gráfico 12 - Perfil de liberação do fármaco das nanopartículas com diferentes teores dos monômeros.



Fonte: Autora.

Sendo assim, apesar de termos sintetizado um copolímero com uma nova proporção molar entre os monômeros (20:80), cujo valor de  $T_g$  foi diminuído para 23 °C conforme o esperado, pelo fato de ambas as NP sintetizadas estarem no estado elástico durante o teste, os perfis de liberação apresentados foram os mesmos.

## 6 CONCLUSÃO

Com a realização do presente trabalho foi possível investigar as possíveis causas do baixo perfil de liberação apresentado pelo fármaco a partir das nanopartículas poliméricas.

Em relação a suspeita de degradação do fármaco, pôde-se verificar que apesar de a rifampicina estar presente durante toda a síntese das nanopartículas, sendo, portanto, submetida às condições da polimerização RAFT em miniemulsão, ela se mantém estável no meio reacional.

A proposta de síntese das nanopartículas com proporção molar 20:80 (MMA:BMA) foi conduzida, e as reações de polimerização em miniemulsão foram realizadas com sucesso na presença de surfactante, levando a formação de látices estáveis e nanopartículas com cerca de 200 nm de diâmetro.

A liberação do fármaco a partir das nanopartículas formadas com o copolímero na proporção 20:80 ( $T_g \sim 23 \text{ }^\circ\text{C}$ ) apresentou o mesmo perfil das NP sintetizadas com a proporção 40:60 ( $T_g \sim 38 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Apesar de o copolímero de proporção 20:80 ter apresentado um menor valor de  $T_g$ , conforme previsto, a  $T_g$  do copolímero de proporção 40:60 não foi tão distante. Como ambos os copolímeros encontram-se no estado elástico no teste de liberação, as NP são maleáveis o suficiente para proporcionarem o mesmo perfil de liberação para o fármaco.

Apesar de semelhantes, o perfil de liberação do fármaco a partir das NP sintetizadas continua sendo baixo. Sendo assim, outros fatores devem estar afetando o processo de liberação.

## REFERÊNCIAS

1. HIJJAR, Miguel A; PROCÓPIO, Maria José. Tuberculose – Epidemiologia e Controle no Brasil. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 5, n.2, p. 15-23, 2006. Disponível em: <<https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/9201/7087>>. Acesso em: 21 set. 2022.
2. GIACOMETTI, Monique Teixeira *et al.* Atenção farmacêutica no tratamento de tuberculose. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, São Paulo, v. 7, n. 8, p. 296–309, 2021. Disponível em: <[doi.org/10.51891/rease.v7i8.1885](https://doi.org/10.51891/rease.v7i8.1885)>. Acesso em: 21 set. 2022.
3. KASAEVA, Tereza. **WHO World TB Day Newsletter**. World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/24-03-2022-who-world-tb-day-newsletter>>. Acesso em: 17 ago. 2022.
4. ARAÚJO, Renan Vinicius De *et al.* Malaria and tuberculosis as diseases of neglected populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, p. 1-20, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0074-02760200229>>. Acesso em: 21 set. 2022.
5. SAN PEDRO, Alexandre; OLIVEIRA, Rosely Magalhães. Tuberculose e indicadores socioeconômicos: revisão sistemática da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s.l.], v.33, n. 4, p. 294–301, 2013. Disponível em: <[https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource\\_ssm\\_path=/media/assets/rpsp/v33n4/a09v33n4.pdf](https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpsp/v33n4/a09v33n4.pdf)>. Acesso em: 21 set. 2022.
6. **O que você precisa saber sobre doenças negligenciadas e como elas afetam sua vida**. Repositório de Notícias da Universidade Federal de Lavras. Disponível em: <<https://www.ufla.br/dcom/2018/05/15/o-que-voce-precisa-saber-sobre-doencas-negligenciadas-e-como-elas-afetam-sua-vida/>>. Acesso em: 19 ago. 2022.
7. **Global tuberculosis report 2021**. World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

8. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030.** World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>>. Acesso em: 19 ago. 2022.
9. BARREIRA, Draurio. The challenges to eliminating tuberculosis in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 1–3, 2018. Disponível em: <<https://www.scielosp.org/pdf/ress/2018.v27n1/e00100009/en>>. Acesso em: 21 set. 2022.
10. BARRUCHO, Luis. **Coronavírus: covid-19 já mata mais por dia que a tuberculose, doença infecciosa mais letal do mundo.** BBC News Brasil. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-52135988>>. Acesso em: 17 ago. 2022.
11. **Tuberculosis deaths rise for the first time in more than a decade due to the COVID-19 pandemic.** World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/14-10-2021-tuberculosis-deaths-rise-for-the-first-time-in-more-than-a-decade-due-to-the-covid-19-pandemic>>. Acesso em: 20 ago. 2022.
12. **Summary of tuberculosis data.** World Health Organization. Disponível em: <[https://worldhealthorg.shinyapps.io/TBrief/?\\_inputs\\_&sidebarCollapsed=true&entity\\_type=%22group%22&group\\_code=%22global%22&sidebarItemExpanded=null](https://worldhealthorg.shinyapps.io/TBrief/?_inputs_&sidebarCollapsed=true&entity_type=%22group%22&group_code=%22global%22&sidebarItemExpanded=null)>. Acesso em: 20 ago. 2022.
13. NETTO, Antonio Ruffino. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 1, p. 51–58, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000100010>>. Acesso em: 21 set. 2022.
14. NETTO, Antonio Ruffino. IMPACTO DA REFORMA DO SETOR SAÚDE SOBRE OS SERVIÇOS DE TUBERCULOSE NO BRASIL. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 7, n.1, p. 7–18, 1999.
15. **Boletim Epidemiológico.** Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de>>

conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-numero-especial-marco-2022.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2022.

16. **WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-susceptible tuberculosis treatment.** World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240048126>>. Acesso em: 14 ago. 2022.

17. **Tuberculose.** Saúde de A a Z, Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tuberculose>>. Acesso em: 14 ago. 2022.

18. **FURP – Rifampicina**, bula para o paciente. Fundação para o remédio popular, Governo do estado de São Paulo. Disponível em: <<http://furp.sp.gov.br/produtos/busca.aspx>>. Acesso em: 08 ago. 2022.

19. **FURP – Rifampicina**, bula para o profissional. Fundação para o remédio popular, Governo do estado de São Paulo. Disponível em: <<http://furp.sp.gov.br/produtos/busca.aspx>>. Acesso em: 08 ago. 2022.20.

20. GROBBELAAR, Melanie *et al.* Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 74, p. 1-9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103937>>. Acesso em: 21 set. 2022.

21. SOUZA, Marcus Vinícius Nora; CARDOSO, Silvia Helena; RIENTE, Rosilene Ribeiro. A natureza no combate à tuberculose. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 95–100, 2009.

22. FLOSS, Heinz G; YU, Tin-wein. Rifamycin - Mode of Action , Resistance , and Biosynthesis. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 105, n. 2, p. 621–632, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cr030112j>>. Acesso em: 21 set. 2022.

23. AGRAWAL, Shrutidevi; PANCHAGNULA, Ramesh. Implication of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics of Rifampicin in Variable Bioavailability from Solid Oral Dosage Forms. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, [s.l.], v. 26, n. 8, p. 321–334, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bdd.464>>. Acesso em: 21 set. 2022.

24. ISRAILI, Zafar H; ROGERS, C Milford; EL-ATTAR, Hanan. Pharmacokinetics of Antituberculosis Drugs in Patients. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 78–83, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/009127008702700113>>. Acesso em: 21 set. 2022.
25. BRAZ, Cyntia de lima *et al.* Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450 utilizados por idosos em domicílio. **Revista Médica de Minas Gerais**, [s.l.], v. 28, p. 1-9, 2018. Disponível em: <<http://www.dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20180069>>. Acesso em: 21 set. 2022.
26. HOWARD, Paul *et al.* Rifampin (INN Rifampicin). **Journal of Pain and Symptom Management**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 891–895, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2015.09.004>>. Acesso em: 21 set. 2022.
27. GROSSET, Jacques; LEVENTIS, Stephanie. Adverse Effects of Rifampin. **Reviews of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 5, supplement 3, p. S440–S446, 1983.
28. PUROHIT, S.D. *et al.* R1FAMPICIN AND HEPATIC TOXICITY. **Indian Journal of Tuberculosis**, [s.l.], v. 30, p. 107–109, 1983.
29. BISAGLIA, Joana Buarque *et al.* ATUALIZAÇÃO TERAPÊUTICA EM TUBERCULOSE: PRINCIPAIS EFEITOS ADVERSOS DOS FÁRMACOS. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 53–59, 2003.
30. ZHANG, L. *et al.* Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, p. 585–594, 2010.
31. AZEVEDO, Marcelo Mantovani Martiniano. **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos**. 202. 20 f. Monografia (Avaliação do curso Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV – Introdução à Nanotecnologia: Um Enfoque Químico) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
32. BIZERRA, Alexa; SILVA, Viviane. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, Três Lagoas, v. 3, n. 2, p. 1–12, 2016.

33. MARTINS, Kelly Fernanda. **Obtenção e caracterização de microesferas do copolímero PLDLA contendo Paclitaxel**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2013.
34. SILVA, Ingrid Dantas Vasconcelos. **Preparação e caracterização de blendas formadas por goma xantana e poli (álcool vinílico) para aplicação na área de liberação controlada de fármacos**. 2014. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.
35. MOAD, Graeme; RIZZARDO, Ezio; THANG, San H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. **Australian Journal of Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 379–410, 2005.
36. OLIVEIRA, Marco Antonio M; NELE, Márcio; PINTO, José Carlos. Polimerização RAFT em Miniemulsão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 23, n. 6, p. 784–797, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4322/polimeros.2014.013>>. Acesso em: 21 set. 2022.
37. OLIVEIRA, Marco *et al.* Use of a Trithiocarbonyl RAFT Agent without Modification as (Co)Stabilizer in Miniemulsion Polymerization. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 10, p. 1687–1695, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pola.28515>>. Acesso em: 21 set. 2022.
38. SAMELO, Jaime Amadeu Cruz Reis. **Estudo da Interação da RIF com Bicamadas Lipídicas**. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.
39. **Product Information - Rifampicin**. Cayman Chemical. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/product/14423>>. Acesso em: 08 set. 2022.
40. GALLO, Gian G.; RADAELLI, Pietro. **Analytical Profiles Of Drug Substances**. Vol. 5. [s.l.]. Edited by Klaus Florey, 1976. 580 p. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60328-7](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60328-7)>. Acesso em: 21 set. 2022.