

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FÁRMACIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**RAQUEL GREGORIO ARRIBADA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO BIODEGRADÁVEIS  
CONTENDO CIDOFOVIR COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA  
PAPILOMATOSE LARÍNGEA RECORRENTE**

Belo Horizonte

2018

RAQUEL GREGORIO ARRIBADA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO BIODEGRADÁVEL  
CONTENDO CIDOFOVIR COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA  
PAPILOMATOSE LARÍNGEA RECORRENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Belo Horizonte

2018

Arribada, Raquel Gregorio.

A775d Desenvolvimento de sistema de liberação biodegradável contendo cidofovir como alternativa para o tratamento da papilomatose laríngea recorrente / Raquel Gregorio Arribada. – 2018.  
130 f. : il.

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.  
Coorientador: André Luís Branco de Barros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Laringe – Doenças – Teses. 2. Papilomatose laríngea recorrente – Teses. 3. Neoplasias laríngeas – Teses. 4. Virus do papiloma – Teses. 5. Cidofovir – Teses. 6. Tecnésio – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Barros, André Luís Branco de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.22

**Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



### FOLHA DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO BIODEGRADÁVEIS  
CONTENDO CIDOFOVIR COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA  
PAPILOMATOSE LARÍNGEA RECORRENTE

### RAQUEL GREGORIO ARRIBADA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aprovada em 02 de março de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Armando da Silva Costa Júnior - Orientador

UFMG

Prof. André Luiz Branco de Barros - Coorientador

UFMG

Profa. Elaine Amândio Leite

UFMG

Prof. Edwin Tomazinho

USP

Belo Horizonte, 2 de março de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, Nossa Senhora e aos meus Anjos da Guarda por me guiarem, protegerem e me manterem firme na minha jornada.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior, pelo carinho que vem desde a graduação, por ter me recebido no seu grupo e acreditado tanto no meu potencial ao confiar a mim um projeto pelo qual demonstrava tamanho interesse.

Ao professor André Luís Branco de Barros, por ter aceitado trabalhar comigo e por ter contribuído em grande parte deste projeto, sempre com muita boa vontade em ajudar e ensinar.

Ao professor Edwin Tamashiro, pela contribuição com as análises histológicas e por demonstrar a grande relevância deste projeto.

À Nara, por toda ajuda, paciência e dedicação. Obrigada por todas as horas passadas no laboratório para me ajudar a desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Danilo Rodrigues, pela contribuição com as explicações e ensinamentos durante as experimentações em animais, sempre vindo de tão longe com disposição para me ajudar.

Ao Diego Santos de Oliveira, por, de forma tão inesperada, ter entrado neste projeto e contribuído com tanto conhecimento teórico-prático, fundamentais para que parte deste trabalho fosse desenvolvido.

À professora Maria Irene, pela gentileza em realizar as análises térmicas.

À professora Lirlândia pela colaboração e por disponibilizar o seu laboratório.

Ao Batista, Adelaide e Clarete pela boa vontade de todos os dias em nos ajudar.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e ao programa de Pós-graduação pela oportunidade.

Aos colegas de trabalho, professores e funcionários do Departamento de Produtos Farmacêuticos, pelo companheirismo, troca de conhecimentos e ajuda de todos os dias, especialmente ao Diego Oliveira, pela colaboração no desenvolvimento das formulações.

Aos meus amigos fora da caixa, obrigada por todos os cafés, abraços, colos, discussões astrológicas e hábitos saudáveis. Obrigada por serem apoio, por trazerem uma energia tão boa para o nosso dia-a-dia, e pela contribuição essencial para a realização deste trabalho.

Minha família é a grande merecedora do meu agradecimento. Pelo incentivo, cumplicidade e confiança. Obrigada por serem a minha dose diária de amor incondicional e determinação. À minha maravilhosa mãe, Vera, ao meu grande pai, Maurício, aos meus irmãos parceiros da vida, Alexandre e Guilherme... obrigada por serem grande parte de mim. Aos tios, tias, primos, primas e amigos, obrigada pelo companheirismo e por vibrarem junto comigo. Eu amo vocês!

*"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez"*

## RESUMO

A Papilomatose laríngea recorrente (PLR) é um processo crônico causado pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) e que acomete principalmente crianças e adolescentes. Além de não existir nenhum tratamento definitivo, são necessárias diversas intervenções cirúrgicas para o controle da doença, o que gera bastante desconforto para o paciente. O uso de antivirais como adjuvantes no tratamento da PLR tem demonstrado maior eficácia no controle das lesões laríngeas, sendo a formulação injetável contendo cidofovir (CDV) um dos medicamento *off-label* mais utilizado atualmente. A injeção intralesional de cidofovir, entretanto, apresenta limitações quanto à biodisponibilidade do fármaco, uma vez que há perda da solução injetada na cavidade laríngea. Nesse contexto, teve-se por objetivo com esse projeto o desenvolvimento de sistemas de liberação biodegradáveis compostos por suspensões injetáveis de microesferas (MEs) à base do copolímero do ácido láctico e glicólico (PLGA) 75:25 e à base de uma blenda de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) K100 e carbopol 940, contendo CDV. As MEs foram produzidas pelo método de emulsificação simples seguida de evaporação do solvente. Os estudos de caracterização *in vitro* mostraram compatibilidade entre o fármaco e os polímeros, bem como características morfológicas adequadas. Os estudos *in vivo* realizados comprovaram a biocompatibilidade e ausência de toxicidade dos sistemas desenvolvidos, por meio de análise histológica da prega vocal de coelhos após a administração local dos sistemas e do ensaio da membrana corioalantoica em embrião de galinha. Realizou-se a radiomarcagem do CDV e das MEs desenvolvidas com tecnécio-99m, que permitiu comparar e confirmar a aderência das partículas após injeção local nas pregas vocais por um período de tempo maior em relação à solução de CDV, a qual é utilizada atualmente na clínica, por meio da obtenção de imagens cintilográficas. Além disso, a partir da radiomarcagem do CDV também foi possível desenvolver um radiotraçador para elucidar o comportamento do fármaco no organismo.

**Palavras-chave:** papilomatose laríngea recorrente. Cidofovir. Microesferas poliméricas. HPMC. Carbopol. PLGA. Tecnécio-99m.



## ABSTRACT

Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is a chronic disease caused by Human Papilloma Virus (HPV) and affects mainly children and teenagers. Besides there is no definitive treatment, several surgical interventions are necessary for the maintenance of the disease, which causes considerable discomfort. The use of antivirals as adjuvants on the treatment of RRP has been shown to be more effective in the control of laryngeal lesions, with cidofovir (CDV) being the most used off-label drug currently used. Intralesional injection of CDV, however, shows limitations on the bioavailability of the drug, since there is loss of the solution injected into the laryngeal cavity. Thus, the search for therapeutic innovations, as well as the development of new formulations, have been the subject of studies concerning the treatment of RRP. The development of controlled drug delivery systems emerges as an alternative to modulate the release kinetics of the active substance and prolong its permanence at the site of action, which allows a reduction in the frequency of administration of the dose and, in this case, a reduction in the number of injections during the treatment. In this context, the aim of this project was the development of biodegradable release systems composed of injectable suspensions of microspheres based on PLGA 75:25 and based on a blend of HPMC K100 and carbopol 940 containing CDV. MEs were produced by the simple emulsification method followed by solvent evaporation, and were characterized by pH, zeta potential, size distribution, drug encapsulation content, scanning electron microscopy and thermal analysis. *In vitro* studies showed absence of incompatibilities between the drug and the polymers and adequate morphological characteristics. The *in vivo* studies were performed to verify the biocompatibility and absence of toxicity of the developed systems, through histological analysis and the chorioallantoic membrane assay. CDV radiolabeling was performed with technetium-99m in order to develop a radiotracer to elucidate the drug's behavior in the body. Through the radiolabelling of the CDV and the developed MEs, it was also possible to compare and confirm the adhesion of the particles after local injection in the vocal folds for a longer time in relation to the CDV solution, which is currently used in the clinic.

Keywords: Recurrent respiratory papillomatosis, cidofovir, polymeric microspheres, HPMC, carbopol, PLGA, technetium-99

## LISTA DE FIGURAS

1. Visão superior da laringe apresentando papilomas (A) e da via aérea inferior (B) (MAUNSELL, 2017). **21**
2. Estrutura química do cidofovir (base anidra). **24**
3. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: sistema de liberação convencional x sistema de liberação controlada (MARTINS, 2013). **27**
4. Visão geral do desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos desde a pesquisa básica até aplicações clínicas. Os principais componentes dos sistemas de liberação e os processos envolvidos são mostrados em negrito, e as subseções de cada componente são mostradas nas caixas pontilhadas (PARK, 2014). **28**
5. Principais carreadores de ativos utilizados na liberação controlada de fármacos (adaptado de MARTINS, 2013). **29**
6. Estrutura química do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA). **31**
7. Relação entre a proporção dos monômeros de ácido lático e ácido glicólico no tempo de meia-vida de degradação do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA). O gráfico ilustra como a proporção entre os monômeros pode ser ajustada de modo a resultar na taxa de biodegradação do polímero e liberação do fármaco no tempo desejado (adaptado de LEE, 2010). **32**
8. Estruturas químicas da (a) celulose natural e (b) hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (SILVA, 2003). **34**
9. Mecanismo de liberação de fármaco de sistema matricial hidrofílico **35**
10. Estrutura química geral dos carbopois. **36**
11. Estabilidade *in vitro* do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em função do tempo na presença de salina, em temperatura ambiente, e na presença de plasma de camundongo, a 37°C. **47**
12. Clearance plasmático do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em camundongos Swiss fêmea. Os dados representam a porcentagem média (n=7) da dose injetada **50**

de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV por grama de sangue,  $\pm$  DP.

13. Perfil de distribuição do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV após a injeção intravenosa pela veia caudal de camundongos Swiss fêmea. Os dados representam a porcentagem média (n=7) da dose injetada de $^{99m}\text{Tc}$ -CDV por grama de tecido, $\pm$ DP.	51
14. Imagens cintilográficas obtidas em 1 (A) e 4 h (B) após a injeção de $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em camundongos sadios. As setas indicam a captação óssea do radiofármaco.	53
15. Sobreposição dos cromatogramas referentes ao cidofovir (azul), fase móvel (vermelho), diluente (rosa) e PLGA (turquesa).	59
16. Curva de calibração obtida pelo cidofovir no intervalo de 5,0 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$ .	60
17. Cromatograma do cidofovir (15,0 $\mu\text{g/mL}$ ) referente à concentração de 100% da precisão.	60
18. Fluxograma contendo as condições ideais para o preparo das microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA).	64
19. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes às microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) brancas em suspensão (A e B) e liofilizadas (C e D).	74
20. Fluxograma contendo as condições ideais para obtenção das microesferas da blenda de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carbopol.	80
21. Estrutura química do cidofovir (A) e da citidina monofosfato (B).	81
22. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes às microesferas da blenda de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carbopol brancas em diferentes aumentos.	86
23. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes às MEs da blenda de HPMC e carbopol contendo CTD em diferentes aumentos.	90
24. Espectro dos raios X característicos correspondente à análise das	91

- microesferas contendo citidina pela técnica de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS)
- 25.** Sobreposição das curvas DSC do carbopol (preto), HPMC (vermelho), citidina (verde), microesferas da blenda branca (azul) e MEs da blenda contendo a citidina (rosa), em atmosfera dinâmica de nitrogênio. **95**
  - 26.** Incubadora automática digital. **99**
  - 27.** Fluxograma do ensaio da membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM). **100**
  - 28.** Laringe de coelho *New Zealand* em corte coronal ântero-posterior, extraída para análise histológica de biocompatibilidade. As pregas vocais estão indicadas pelas setas vermelhas. **103**
  - 29.** Imagens da membrana corioalantoica de embriões de 7 dias de vida que foram submetidas aos diferentes grupos de tratamento analisados. **107**
  - 30.** Ensaio de membrana corioalantoica realizado com PBS (controle), bevacizumabe (500 µg/mL), cidofovir (0,7 µM), microesferas de PLGA (0,65 mg da formulação), microesferas da blenda branca (0,65 mg da formulação) e microesferas da blenda contendo cidofovir (0,65 mg da formulação). O percentual de vasos sanguíneos do grupo tratado foi expresso em relação ao percentual do grupo controle, fixado em 100%. \* Significativamente diferente do grupo controle. \*\* Significativamente diferente do grupo tratado com bevacizumabe (500 µg/mL). (P<0,05). **108**
  - 31.** Corte histológico da laringe de coelhos *New Zealand* do grupo controle em coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). **110**
  - 32.** Corte histológico da laringe de coelhos *New Zealand* do grupo tratado com citidina no período de 7 (A) e 30 dias (B) após as injeções em coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). As setas indicam área de intensa fibrose, com pouca reação inflamatória local. **111**
  - 33.** Corte histológico da laringe de coelhos *New Zealand* do grupo tratado com MEs de PLGA no período de 7 (A) e 30 dias (B) após as injeções em coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). As setas indicam áreas com desprendimento do estroma. **112**

- 34.** Imagens cintilográficas adquiridas em gama câmara evidenciando o comportamento da solução de cidofovir radiomarcada com  $^{99m}\text{Tc}$  na laringe de coelhos *New Zealand* nos tempos de 1 (A), 4 (B), 8 (C) e 24 h (D). **113**
- 35.** Imagens cintilográficas adquiridas em gama câmara evidenciando o comportamento das microesferas de PLGA brancas radiomarcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  na laringe de coelhos *New Zealand* nos tempos de 1 (A), 4 (B), 8 (C) e 24 h (D). **114**
- 36.** Imagens cintilográficas adquiridas em gama câmara evidenciando o comportamento das microesferas da blenda de HPMC e carbopol radiomarcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  na laringe de coelhos *New Zealand* nos tempos de 1 (A), 4 (B) e 8 h (C). **114**

## LISTA DE TABELAS

1. Variação do volume da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para otimização da radiomarcagem do cidofovir.	45
2. Variação do pH para otimização da radiomarcagem do cidofovir.	45
3. Distribuição de tamanho e índice de polidispersão da formulação de microesferas do ácido poli l'ístico-co-glicólico (PLGA) obtida (valores expressos como média $\pm$ DP).	70
4. Distribuição de tamanho e índice de polidispersão da formulação de microesferas da blenda de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carbopol brancas (valores expressos como média $\pm$ DP).	86
5. Distribuição de tamanho e índice de polidispersão da formulação de microesferas da blenda de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carbopol contendo citidina (valores expressos como média $\pm$ DP).	86
6. Relação dos elementos químicos identificados nas microesferas contendo citidina pela técnica de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS).	92
7. Percentual de vasos sanguíneos expressos em relação ao grupo controle fixado em 100%.	108

## LISTA DE QUADROS

1. Propriedades físico-químicas do cidofovir.	24
2. Condições cromatográficas para validação do método de quantificação do cidofovir por CLAE.	58
3. Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos durante a validação do método de quantificação do cidofovir por CLAE.	58
4. Composição, em porcentagem, de todos os componentes da formulação de microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA).	64
5. Condições ótimas de análise das microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) por microscopia eletrônica de varredura (MEV).	67
6. Composição, em porcentagem, de todos os componentes da formulação de microesferas da blenda de HPMC e carbpol.	79
7. Condições ótimas de análise das microesferas da blenda de HPMC e carbpol por microscopia eletrônica de varredura (MEV).	82
8. Relação dos grupos do experimento da membrana corioalantoica de embrião de galinha (MCA) e dos respectivos tratamentos.	100
9. Relação dos grupos de estudo para a realização das análises histológicas.	102
10. Escala ponderal de avaliação histológica de infiltrado inflamatório.	104
11. Escala ponderal de avaliação histológica de fibrogênese.	104
12. Escala ponderal de avaliação histológica de neovascularização.	104
13. Escala ponderal de avaliação histológica de áreas de necrose.	104
14. Análise histológica da laringe de coelhos <i>New Zealand</i> , em escala ponderal, do grupo controle.	110
15. Análise histológica da laringe de coelhos <i>New Zealand</i> , em escala ponderal, do grupo tratado com cidofovir.	111
16. Análise histológica da laringe de coelhos <i>New Zealand</i> , em escala ponderal, do grupo tratado com MEs de PLGA.	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Grau centígrado

µg - Micrograma

ACN - Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDV – Cidofovir

cP - centipoise

CTD - Citidina

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – Detector de arranjos de diodos (do inglês- *diode array detector*)

DPR – Desvio padrão relativo

DSC – Calorimetria diferencial exploratória (do inglês – *differential scanning calorimeter*)

FDA – *Food and Drug Administration*

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva (do inglês – *Energy dispersive X-ray spectroscopy*)

g/mol – Gramas por mol

h – hora

HE – Hematoxilina-eosina

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

HPV – Papilomavírus humano (do inglês – *Human papilloma virus*)

IP – Índice de polidispersão

MCA – Membrana corioalantoica

MEs - Microesferas

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg - Miligrama

min - Minuto

mL - Mililitro

MM – Massa molar

PBS – Solução tampão fosfato (do inglês – *Phosphate buffered solution*)

PLGA – Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico)

PLR – Papilomatose laríngea recorrente



RPM – Rotação por minuto

TM – Tricrômio de Masson

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USP – Universidade de São Paulo

USP 24 – *The United States Pharmacopeia 24*

UV - Ultravioleta

VEGF – Fator de crescimento endotelial (do inglês – *Vascular endothelial growth factor*)

## SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1.1	A papilomatose laríngea recorrente.....	20
1.2	O cidofovir .....	23
1.3	Sistemas de liberação controlada de fármacos.....	26
1.3.1	Micropartículas poliméricas biodegradáveis .....	30
1.3.2	Polímeros e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico.....	31
1.3.3	Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) .....	33
1.3.4	Carbopois .....	35
1.4	O uso de radiotraçadores com $^{99m}\text{Tc}$ em estudos <i>in vivo</i> .....	37
2	CAPÍTULO I: Desenvolvimento do radiotraçador $^{99m}\text{Tc}$ -CDV e avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	39
2.1	OBJETIVOS .....	40
2.1.1	Objetivo Geral.....	40
2.1.2	Objetivos Específicos .....	40
	RADIOMARCAÇÃO DO CDV E REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....	41
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.2.1	Materiais .....	41
2.2.2	Métodos.....	41
2.2.2.1	Radiomarcção do CDV e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade.....	41
2.2.2.2	Determinação da estabilidade de marcação do CDV em solução salina e em plasma .....	42
2.2.2.3	Determinação da ligação do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV a proteínas plasmáticas .....	43
2.2.2.4	Determinação do clearance plasmático do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV .....	43
2.2.2.5	Determinação do perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV.....	44
2.2.2.6	Obtenção de imagens cintilográficas após a administração do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV	44
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
2.3.1	Radiomarcção do CDV e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade.....	45
2.3.2	Determinação da estabilidade de marcação do CDV em solução salina e em plasma .....	46
2.3.3	Determinação da ligação do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV a proteínas plasmáticas .....	47
2.3.4	Determinação do clearance plasmático do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV.....	49

2.3.5	Determinação do perfil de biodistribuição do <sup>99m</sup> Tc-CDV.....	50
2.3.6	Obtenção de imagens cintilográficas após a administração do <sup>99m</sup> Tc-CDV	52
2.4	CONCLUSÃO.....	53
3	CAPÍTULO II: Desenvolvimento e caracterização <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de sistemas poliméricos para veiculação do CDV .....	54
3.1	OBJETIVOS .....	55
3.1.1	Objetivo Geral.....	55
3.1.2	Objetivos Específicos .....	55
4	CAPÍTULO II, PARTE 1: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO CDV POR CLAE .....	56
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1.1	Materiais .....	57
4.1.2	Métodos.....	57
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.3	CONCLUSÃO.....	61
5	CAPÍTULO II, PARTE 2: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS.....	62
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
5.1.1	Materiais .....	63
5.1.2	Métodos.....	63
5.1.2.1	Desenvolvimento de microesferas biodegradáveis à base de PLGA 75:25 brancas e contendo CDV.....	63
5.1.2.2	Distribuição do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das microesferas .....	65
5.1.2.3	Estudo da morfologia das MEs por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	65
5.1.2.4	Avaliação do teor de encapsulação do CDV nas MEs.....	67
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.2.1	Desenvolvimento das microesferas biodegradáveis à base de PLGA 75:25 brancas e contendo CDV .....	67
5.2.2	Distribuição do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das MEs.....	70
5.2.3	Estudo da morfologia das MEs por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	73
5.2.4	Avaliação do teor de encapsulação do CDV nas MEs .....	75
5.3	CONCLUSÃO.....	77

5.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
5.4.1	Materiais .....	77
5.4.2	Métodos.....	78
5.4.2.1	Desenvolvimento das microesferas biodegradáveis à base de HPMC K100 e Carbopol 940 brancas e contendo CDV.....	78
5.4.2.2	Distribuição do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das microesferas.....	81
5.4.2.3	Estudo da morfologia das MEs por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	81
5.4.2.4	Avaliação do teor de encapsulação da CTD nas MEs.....	82
5.4.2.5	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	83
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.5.1	Desenvolvimento das microesferas biodegradáveis à base de HPMC K100 e Carbopol 940 brancas e contendo CD.....	83
5.5.2	Distribuição do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das microesferas .....	86
5.5.3	Avaliação do teor de encapsulação da CTD nas MEs .....	92
5.5.4	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	94
5.6	CONCLUSÃO.....	96
6	CAPÍTULO II, PARTE 3: CARACTERIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS DESENVOLVIDOS .....	97
6.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	98
6.1.1	Materiais .....	98
6.1.2	Métodos.....	98
6.1.2.1	Avaliação da citotoxicidade em membrana corioalantoica (MCA) .....	98
6.1.2.2	Avaliação histológica da resposta inflamatória em prega vocal de coelho após injeção local de CDV e das MEs de PLGA.....	101
6.1.2.3	Avaliação qualitativa da aderência das MEs de PLGA e da blenda de HPMC e carbopol radiomarcadas com <sup>99m</sup> Tc nas pregas vocais de coelhos <i>New Zealand</i> .....	104
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
6.2.1	Avaliação da citotoxicidade em membrana corioalantoica (MCA) .....	106
6.2.2	Avaliação histológica da resposta inflamatória em prega vocal de coelho após injeção local de CDV e das MEs de PLGA.....	110
6.2.3	Avaliação qualitativa da aderência das MEs de PLGA e da blenda de HPMC e carbopol radiomarcadas com <sup>99m</sup> Tc nas pregas vocais de coelhos <i>New Zealand</i> .....	113

6.3	CONCLUSÃO.....	115
7	CONCLUSÃO GERAL.....	116
8	PERSPECTIVAS .....	117
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

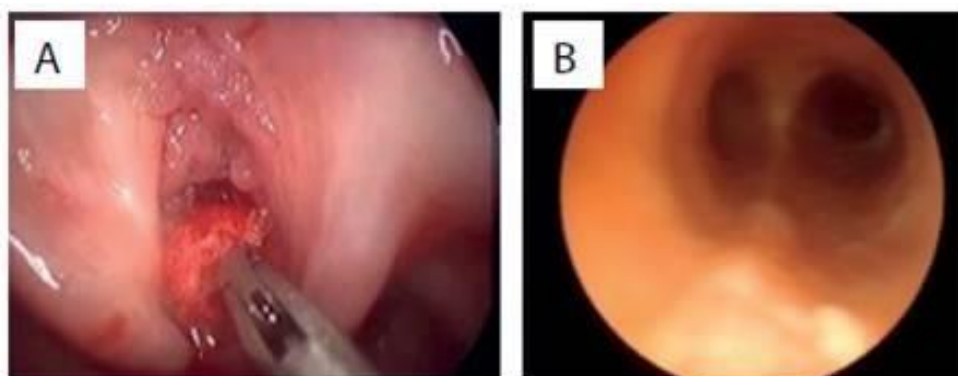
### 1.1 A papilomatose laríngea recorrente

O aparecimento de papilomas na cavidade laríngea e faríngea em crianças foi primeiramente identificado por Sir Morrell Mackenzie, ao final de 1800. A primeira denominação de “papilomatose laríngea juvenil”, entretanto, só foi descrita em meados de 1940 por Chevalier Jackson (GOON et al., 2008), sendo que apenas em 1980 confirmou-se a presença de DNA HPV nas lesões. A caracterização e tipagem do vírus foram realizadas por Gissman e colaboradores, confirmando o papel do HPV na ocorrência da papilomatose laríngea (VENKATESAM; PINE; UNDERBRINK, 2013).

Estima-se que a papilomatose laríngea recorrente (PLR) está presente em 4,3 a cada 100.000 crianças e em 1,8 a cada 100.000 adultos nos Estados Unidos, sendo que a incidência da doença é maior em pacientes de condição socioeconômica mais baixa (VENKATESAM; PINE; UNDERBRINK, 2013)(MAUNSELL; BELLOMO-BRANDÃO, 2017).

A PLR, também conhecida por Papilomatose Respiratória Juvenil, é uma doença crônica causada pelo Papiloma Vírus Humano, o HPV, e afeta principalmente a laringe e a traqueia do paciente (WIERZBICKA et al., 2011). Caracteriza-se pela proliferação de papilomas no trato respiratório, sendo as pregas vocais, a epiglote e as pregas vestibulares da laringe os locais mais acometidos (PONTES et al., 2009). O espalhamento das lesões foi identificado em 30% das crianças e 16% dos adultos com a doença, sendo os lugares mais acometidos, além da laringe, a cavidade oral, a traqueia e os brônquios (DERKAY, 1995). As lesões são do tipo exofítica e proliferativa, constituídas por tecido conjuntivo recoberto por tecido epitelial e ficam aderidas à mucosa das vias aéreas (CARIFI et al., 2015), conforme ilustrado na figura 1.

**Figura 1 – Visão superior da laringe apresentando papilomas (A) e da via aérea inferior (B).**



---

Fonte: (MAUNSELL; BELLOMO-BRANDÃO, 2017)

A maior parte das infecções ocorre durante o parto da criança ou até mesmo durante a gestação. Quando a manifestação da doença só ocorre no indivíduo já adulto, suspeita-se de dois fatores: contato oral ou sexual; ou a infecção ocorreu durante o parto, mas só manifestou-se quando houve uma deficiência do sistema imunológico do paciente (BOLTEŽAR et al., 2011).

O diagnóstico definitivo da PLR pode ser bastante desafiador caso não sejam bem conhecidas as manifestações clínicas da doença. Uma vez que os papilomas desenvolvem-se nas vias aéreas, os principais sintomas englobam rouquidão, tosse crônica, dispneia, disfagia, pneumonia e outras infecções recorrentes do trato respiratório superior, sendo que esses sintomas tendem a se apresentar mais intensos em crianças, devido ao rápido desenvolvimento das lesões (CARIFI et al., 2015).

Apesar de ser relativamente rara e benigna, a doença pode seguir um curso clínico bastante agressivo, dada a dificuldade de controle das lesões (BOLTEŽAR et al., 2011). O curso clínico da doença é variável, de modo que alguns pacientes apresentam remissão espontânea, enquanto outros sofrem com o crescimento agressivo dos papilomas (WILCOX et al., 2014). Assim, a PLR pode apresentar impacto significativo na qualidade de vida do paciente devido à obstrução das vias

aéreas, disfonia e a necessidade de cirurgias em série, sendo que em países em desenvolvimento até 90% dos pacientes pediátricos realizam traqueostomia de urgência (RASMUSSEN et al., 2017). A PLR é mais comumente causada pelos subtipos 6 e 11 do HPV, de modo que o subtipo 11 está mais frequentemente associado a piores prognósticos e maior gravidade clínica (DERKAY; WIATRAC, 2008). O subtipo oncogênico 16 também já foi identificado em casos mais raros, sendo que transformações malignas dos neoplasmas são mais comuns em adultos acometidos pela doença, podendo afetar até 5% dos pacientes (RASMUSSEN et al., 2017).

O tratamento da PLR consiste na remoção dos papilomas da cavidade laríngea a fim de desobstruir as vias aéreas e melhorar a qualidade vocal. Esse procedimento é realizado por meio de microcirurgias, utilizando-se micropinças frias, laser de CO<sub>2</sub> ou microdebridador. Contudo, ainda que todas as lesões tenham sido ressecadas e removidas, a persistência do vírus no local faz com que a doença possa reincidir, como acontece na grande maioria dos casos (PONTES et al., 2009). A traqueostomia costuma ser empregada nos casos mais graves, quando há elevado comprometimento das vias aéreas; entretanto, apesar desse procedimento garantir a passagem do ar, ele acaba fornecendo um novo sítio para a colonização do HPV, servindo como um condutor para a disseminação da doença para a árvore brônquica e, por isso, esse procedimento é reservado apenas para os casos de obstrução respiratória ou nos quais há a necessidade de múltiplas cirurgias (TASCA; CLARKE, 2006).

Dessa forma, faz-se necessário o uso de farmacoterapias adjuvantes, que atuam sob diferentes mecanismos, a fim de evitar ou reduzir o número de intervenções cirúrgicas (PONTES et al., 2009). Dentre os agentes já propostos, encontram-se o interferon, o aciclovir, o carbinol-3-indol, a ribavarina, a vacina contra caxumba e a terapia fotodinâmica (GOON et al., 2008; NK; JAMES, 2010; TASCA; CLARKE, 2006). Apesar de ser um número considerável de opções, essas intervenções foram abandonadas principalmente por não terem mostrado a eficácia esperada para o tratamento da PLR ou por terem apresentado elevada toxicidade com o aparecimento de efeitos adversos para os pacientes.



Por não existir um tratamento bem estabelecido, a busca por agentes terapêuticos *off-label* torna-se bastante comum. Recentemente alguns estudos têm descrito o uso do bevacizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado inibidor da atividade do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), como terapia promissora para a PLR (FERNANDEZ-BUSSY et al., 2017; KALANJERI et al., 2017), uma vez que Rahbar e colaboradores (2005) demonstraram a alta expressão de RNA mensageiro (mRNA) de VEGF-1 e VEGF-2 nos vasos subepiteliais de pacientes com PLR (RAHBAR, 2005). Além do bevacizumabe, a vacina quadrivalente do papilomavírus humano (HPV4), a qual é eficaz contra os subtipos 6, 11, 16 e 18 do HPV, foi utilizada recentemente como adjuvante terapêutico via administração sistêmica e intralesional (KATSUTA et al., 2017). Contudo, apesar de ter mostrado eficácia em alguns estudos, como o uso da vacina está geralmente associado a outras terapias adjuvantes, é difícil elucidar o efeito independente da HPV4 no tratamento da PLR.

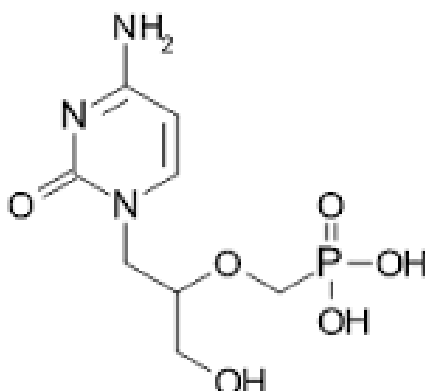
Uma outra alternativa na busca de uma associação eficaz com o tratamento cirúrgico, foi a administração intralesional de antivirais. Dentre os diversos fármacos já testados, o CDV foi o de maior aceitação, por apresentar resultados mais satisfatórios no controle do reaparecimento das lesões.

## **1.2 O cidofovir**

O CDV é um análogo de citosina que apresenta atividade antiviral contra DNA vírus, aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento intravenoso de retinite causada por citomegalovírus em pacientes com a síndrome de imunodeficiência adquirida (BROEKEMA; DIKKERS, 2008). Além do citomegalovírus, já foram demonstradas as ações do CDV contra adeno-, herpes-, irido-, hepadna-, polyoma-, pox- e papilomavírus, sendo que todos os herpesvírus de importância clínica são inibidos pelo CDV (ANDREI; SNOECK, 2010).

O CDV apresenta-se como um pó branco e a sua estrutura química, bem como as características físico-químicas estão relacionadas na figura 2 e no quadro 1, respectivamente.

**Figura 2 – Estrutura química do cidofovir (base anidra).**



**Quadro 1 – Propriedades físico-químicas do cidofovir**

Propriedade	Valor
Fórmula química	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> P
Peso molecular (base anidra)	279,20 g/mol
Solubilidade em água	170,0 mg/mL
pKa	1,19
Log P	-3,3
Ponto de fusão	260°C

Fonte: DrugBank, PubChem, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons

A atividade antiviral do CDV é atribuída à inibição seletiva da DNA polimerase e somente é iniciada após ativação intracelular. Após a sua internalização por endocitose, o CDV passa por duas etapas de fosforilação para ser convertido no seu metabólito ativo difosfato (CDVpp), ao contrário dos seus análogos como aciclovir e ganciclovir, que necessitam de 3 etapas de fosforilação para se tornarem ativos. Uma vez dentro da célula, a meia vida do CDV pode chegar a até 80 h, funcionando como um reservatório a partir do qual o CDVpp pode ser produzido (HADACZEK et al., 2013). O CDVpp apresenta maior afinidade por DNA polimerases virais em relação às polimerases da célula hospedeira, o que contribui para a sua seletividade viral, de modo que ele pode atuar como um inibidor competitivo do substrato natural da enzima DNA polimerase, o dCTP, ou como um substrato alternativo, levando à

sua incorporação ao DNA viral (ANDREI; SNOECK, 2010). Apesar da inibição da DNA polimerase viral ser configurada como o principal mecanismo de ação do CDV, a sua capacidade de induzir a apoptose de células infectadas com DNA vírus também já foi descrita (CARIFI et al., 2015; TASCA; CLARKE, 2006).

O CDV apresenta-se sob a forma de solução injetável com o nome comercial de Vistide<sup>®</sup> e, ainda que tenha sido aprovado oficialmente apenas para o tratamento da retinite causada por citomegalovírus, o seu uso *off-label* como adjuvante de outras farmacoterapias, bem como algumas de suas propriedades farmacocinéticas já foram descritos (ANDREI; SNOECK, 2010; BUCHINSKY et al., 2008; CARIFI et al., 2015). A principal limitação do uso do CDV decorre da sua elevada nefrotoxicidade após administração sistêmica (POLIS et al., 1995), e ela ocorre devido à absorção do CDV pelas células dos túbulos proximais, através de transportadores iônicos, que leva à sua secreção lenta no lúmen e resulta em elevadas concentrações intracelulares do fármaco, podendo provocar necrose tubular. Assim, a coadministração de probenicida, um agente que inibe a reabsorção de sais no túbulo contorcido proximal e a hiperhidratação do paciente apresentam efeito nefroprotetor (CARUSO BROWN et al., 2015). A fim de reduzir a nefrotoxicidade do CDV, alguns estudos que propõem modificações moleculares no CDV já têm sido realizados. Florescu e colaboradores (2012) e Hadaczek e colaboradores (2013) descreveram que o uso de derivados lipídicos do CDV apresentou não só maiores concentrações intracelulares do fármaco ativo, como também permitiu o desenvolvimento de uma forma de administração oral do CDV, além da melhor modulação do perfil de segurança desse fármaco (FLORESCU et al., 2012; HADACZEK et al., 2013).

O uso *off-label* de medicamentos contendo CDV como adjuvante na PLR foi descrito pela primeira vez em 1998 e, desde então, tem demonstrado resultados promissores, desde a administração intralesional (SAHOTA et al., 2011) até a mais recente forma inalável (KSIAZEK et al., 2011). Apesar do uso de doses maiores de CDV, as quais são comumente utilizadas no tratamento da PLR, mostrarem-se seguras (GOON et al., 2008), efeitos adversos como inflamação local, nefrotoxicidade e neutropenia já foram relatados. Além disso, há uma maior preocupação acerca do potencial carcinogênico desse fármaco, visto que já demonstrou-se o desenvolvimento de adenocarcinoma de mama em ratos (SAHOTA

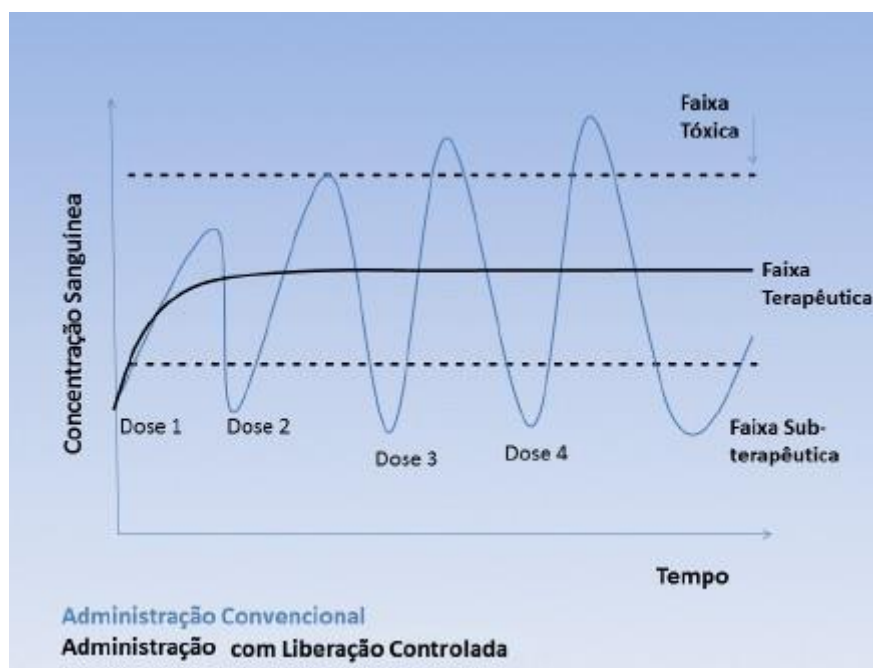
et al., 2011). Ainda assim, apesar das limitações mencionadas, diversos estudos clínicos têm demonstrado que a associação da injeção intralesional do CDV às intervenções cirúrgicas reduz significativamente a reicidiva das lesões no tratamento da PLR (BHADRI; LEE-HORN; SHAW, 2009; KATSUTA et al., 2017; SCHRAFF et al., 2004; TASCA; CLARKE, 2006).

### **1.3 Sistemas de liberação controlada de fármacos**

Desde o início da terapia farmacológica, a manutenção de níveis terapêuticos estáveis dos fármacos tem sido um desafio. O uso de administrações convencionais, como a intravenosa e a oral, apresenta desvantagens, como elevadas concentrações plasmáticas que podem ser tóxicas ou baixas concentrações que podem levar a níveis plasmáticos subterapêuticos, além do possível desenvolvimento de resistência ao fármaco, em alguns casos. No passado, a única maneira de contornar os problemas descritos e manter os níveis plasmáticos do fármaco constantes era submeter o paciente a uma infusão intravenosa, sob uma taxa constante, baseada na farmacocinética do fármaco. Esse tipo de terapia, entretanto, apresenta limitações óbvias quanto à necessidade de monitoramento constante da concentração plasmática do fármaco por profissionais da saúde, não sendo esse, portanto, um procedimento passível de ser realizado no domicílio (DASH; CUDWORTH, 1998).

Assim, considerando-se os efeitos adversos decorrentes da administração das formas farmacêuticas convencionais, além da dificuldade em manter os níveis terapêuticos dos fármacos por um período mais longo no organismo, tem-se buscado inovações terapêuticas como forma de promover uma melhor modulação da biodisponibilidade do fármaco no local desejado, como exemplificado na figura 3.

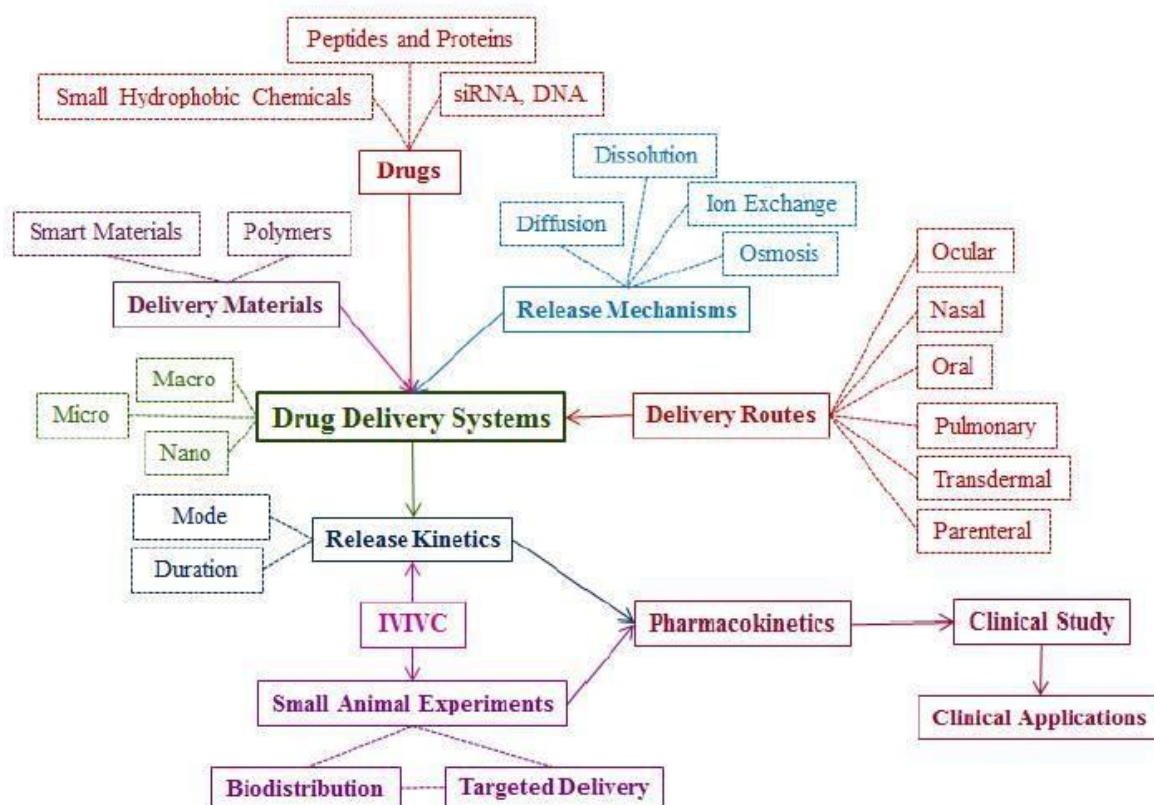
**Figura 3 – Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: sistema de liberação convencional x sistema de liberação controlada.**



Fonte: (MARTINS, 2013)

Nesse contexto, sistemas de liberação controlada de fármacos oferecem inúmeras vantagens em relação aos sistemas convencionais, como redução da toxicidade, entrega do fármaco a sítios específicos, maior conveniência para o paciente e menor custo, uma vez que, além de ser utilizada uma pequena quantidade do princípio ativo, esses sistemas geram uma maior eficiência de aplicação do fármaco (RAVI KUMAR, 2000). Ainda, com o uso desses sistemas é possível contornar problemas associados ao fármaco, como baixa solubilidade, instabilidade no meio biológico (como curto tempo de meia-vida, por exemplo), baixa disponibilidade e efeitos adversos potencialmente perigosos (RAWAT et al., 2006). A disponibilidade do fármaco sob a cinética de liberação desejada requer o conhecimento das suas propriedades físico-químicas, as quais determinarão o tipo do material usado no sistema e o mecanismo de liberação do fármaco (PARK, 2014).

**Figura 4 – Visão geral do desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos desde a pesquisa básica até aplicações clínicas. Os principais componentes dos sistemas de liberação e os processos envolvidos são mostrados em negrito, e as subseções de cada componente são mostradas nas caixas pontilhadas.**



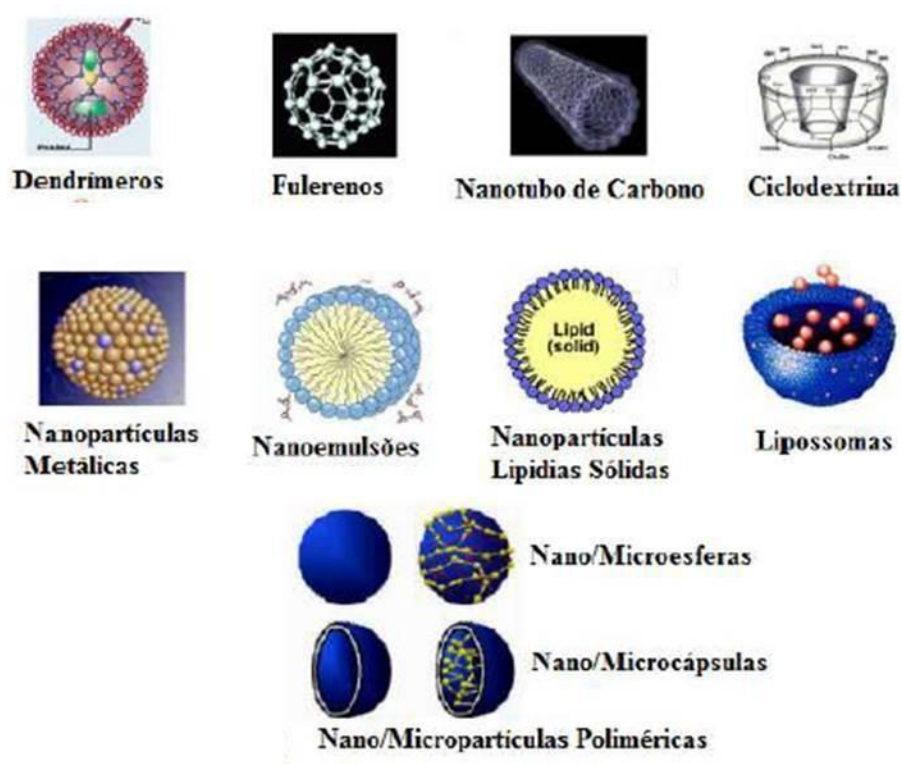
Fonte: (PARK, 2014)

Os carreadores são dispositivos de liberação de fármacos com propriedades e funções específicas, de modo que a associação de fármacos a carreadores pode melhorar suas propriedades cinéticas para melhor modulação da resposta farmacológica. Os micro e nanocarreadores são os mais empregados nos novos estudos de liberação de fármacos, sendo que eles podem ser produzidos a partir de diferentes materiais biodegradáveis, como polímeros naturais e sintéticos, lipídios e até mesmo compostos organometálicos.

A caracterização dos sistemas poliméricos de liberação controlada são úteis na determinação das propriedades físico-químicas dos polímeros e do fármaco, além

de evidenciar as características morfológicas e de desempenho das partículas desenvolvidas. As análises térmicas, como calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (Tg) e infravermelho (IV) indicam possíveis interações entre os compostos, que são evidenciadas por picos endotérmicos nas curvas DSC ou perda de massa nas curvas de Tg, além da composição química da amostra, uma vez que o infravermelho determina grupos funcionais característicos. Ainda, esses sistemas são analisados por microscopia eletrônica, podendo ser de varredura quando deseja-se estudar a morfologia superficial da partícula, ou de transmissão, quando o objetivo é verificar o interior da partícula. As formulações podem ser, ainda, caracterizadas por distribuição de tamanho e potencial zeta das partículas, bem como pode-se determinar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco.

**Figura 5 – Principais carreadores de ativos utilizados na liberação controlada de fármacos**



Fonte: adaptado de (MARTINS, 2013)

### **1.3.1 Micropartículas poliméricas biodegradáveis**

Em meio aos sistemas de liberação controlada, as micropartículas poliméricas vêm ganhando destaque. As micropartículas são pequenas partículas sólidas com tamanho que varia entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ , e subdividem-se em microcápsulas, sistemas do tipo reservatório contendo a substância ativa revestida por polímeros de espessuras variáveis, que constituem a membrana da cápsula, e em microesferas (MEs), sistemas do tipo matricial em que o fármaco encontra-se uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica (SILVA et al., 2003).

A principal vantagem desse tipo de sistema é a possibilidade de injeção local, devido ao tamanho bastante reduzido das partículas (DUARTE BYRRO et al., 2009). Além disso, são sistemas biocompatíveis, mecanicamente resistentes, oferecem flexibilidade na dosagem do fármaco encapsulado, são degradadas por reações simples de hidrólise e produzem produtos não tóxicos (SHCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003).

Diferentes métodos podem ser empregados para a obtenção das MEs (SILVA et al., 2003), entretanto, o método de emulsificação seguida de evaporação do solvente é o mais utilizados para o preparo de MEs devido à facilidade de realização, que envolve o uso de poucos equipamentos, e à reprodutibilidade. O processo de emulsificação simples pode ocorrer de duas formas, sendo uma a emulsão óleo em água (O/A), na qual a fase interna oleosa é dispersa na fase externa aquosa, e a outra uma emulsão água em óleo (A/O), na qual a fase interna aquosa é dispersa na fase externa oleosa. Dessa forma, as duas fases devem ser preparadas e a dispersão do fármaco e do polímero em uma dessas fases vai depender da solubilidade de cada um. A dispersão de uma fase na outra ocorre sob a forma de microgotas e o processo de emulsificação é realizado por um equipamento de agitação mecânica, sendo o mais comum o Ultraturrax<sup>®</sup>. O uso de surfactantes faz-se necessário para manter a individualidade das partículas e o equilíbrio do sistema, o qual é, por natureza, termodinamicamente instável. Uma vez formada a emulsão e conseqüentemente as micropartículas, segue-se com a agitação do sistema até completa evaporação do solvente (SILVA et al., 2003).



Diversos polímeros biodegradáveis são aprovados pelo FDA para a produção das micropartículas. A biodegradabilidade é uma característica bastante visada nesse tipo de sistema, uma vez que é esperado que um material introduzido no organismo seja degradado depois de cumprida a sua função, sem a necessidade de intervenções para a sua remoção (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Dentre os polímeros biodegradáveis, o PLGA é um dos mais utilizados para constituir matrizes hidrofóbicas, enquanto que a HPMC e o carbopol são muito comuns para constituir matrizes hidrofílicas de sistemas matriciais (COMMANDEUR; VAN BEUSEKOM; VAN DER GIESSEN, 2006).

### 1.3.2 Polímeros e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico

O ácido poli lático-co-glicólico (PLGA), cuja estrutura química é mostrada na figura 6, é um dos polímeros biodegradáveis de maior sucesso, pois a sua hidrólise leva aos monômeros ácidos lático e glicólico como metabólitos. Uma vez que esses monômeros são endógenos e facilmente metabolizados pelo ciclo de Krebs em água e dióxido de carbono, uma toxicidade sistêmica mínima é associada ao uso do PLGA em sistemas de liberação ou em aplicações biomateriais (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

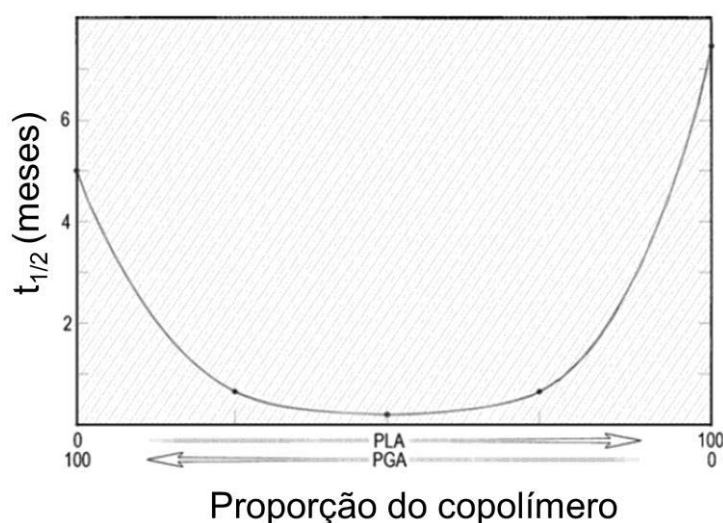
**Figura 6 – Estrutura química do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA)**



O uso do PLGA é aprovado pelo FDA dos Estados Unidos e pelo EMA (*European Medicine Agency*) em diversos sistemas de liberação em humanos. Os polímeros são comercialmente disponíveis em diferentes pesos moleculares e composições dos copolímeros, de modo que as diferentes apresentações do PLGA são

usualmente identificadas pela proporção dos monômeros, isto é, o PLGA 75:25, por exemplo, refere-se ao PLGA composto por 75% de ácido lático e 25% de ácido glicólico (DANHIER et al., 2012). As sucessivas unidades monoméricas de ácido lático e glicólico são unidas por ligações do tipo éster durante o processo de polimerização, e as diferentes proporções entre esses monômeros determinam a velocidade de biodegradação do polímero e conseqüentemente da partícula, de modo que quanto maior a proporção de ácido lático, maior o tempo necessário para degradação.

**Figura 7 – Relação entre a proporção dos monômeros de ácido lático e ácido glicólico no tempo de meia-vida de degradação do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA). O gráfico ilustra como a proporção entre os monômeros pode ser ajustada de modo a resultar na taxa de biodegradação do polímero e liberação do fármaco no tempo desejado**



Fonte: adaptado de (LEE et al., 2010)

O mecanismo de liberação do fármaco pelas micropartículas de PLGA geralmente segue uma cinética de primeira ordem, sendo que a liberação do fármaco depende de fatores como o tipo de polímero (nesse caso, a proporção entre os monômeros dos ácidos lático e glicólico), a capacidade de carga da formulação, a morfologia e a porosidade do sistema (LEE et al., 2010). De maneira geral, a liberação do fármaco pode acontecer por difusão, erosão do polímero ou a combinação dos dois processos. Assim, diferentes fases podem ser distinguidas durante o processo de

liberação *in vivo*, sendo elas *burst*, fase lag e erosão, como detalhado em seguida (TOMIC et al., 2018):

- 1) **Burst:** ocorre durante as primeiras 24 h e é decorrente da dissolução do fármaco presente na superfície das partículas e da difusão do fármaco pelos poros mais superficiais.
- 2) **Fase lag:** ocorre nas 48 a 144 h seguintes ao início da liberação. Durante esse período ocorre entumescimento das partículas, e a liberação do fármaco é mínima.
- 3) **Erosão:** ocorre de 192 a 672 h após o início da liberação. Após a erosão e início do processo de liberação, os fluídos biológicos começam a penetrar nas redes poliméricas.

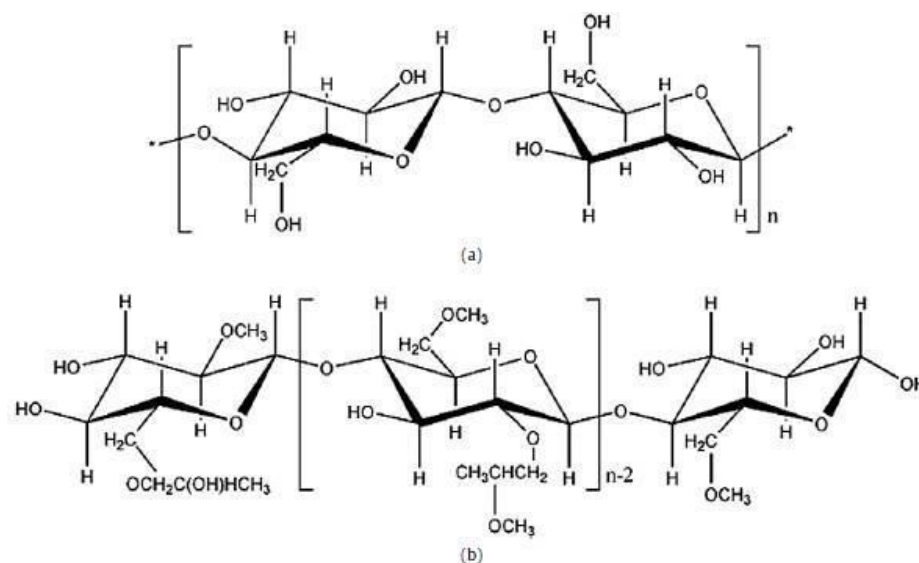
### 1.3.3 Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

Os derivados da celulose solúveis em água são um dos polímeros mais biocompatíveis usados em uma gama de aplicações na área farmacêutica. Particularmente, quando dispersos em água, podem ser usados como espessantes, agentes ligantes, emulsificantes, surfactantes, formadores de filmes, estabilizadores, dentre outros. Um dos derivados mais comuns da celulose é a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (SILVA, 2008). A HPMC, também conhecida como hipromelose, é, portanto, um derivado da celulose não iônico, hidrofílico, solúvel em água e estável em pH que varia de 3 a 11, além de ser resistente à ação enzimática (LI, 2005).

A celulose é um polissacarídeo natural praticamente insolúvel em água devido às fortes ligações de hidrogênio intramoleculares, de modo que os derivados solúveis em água são preparados pela substituição dos grupos hidroxil por outros grupos funcionais que diminuem a cristalinidade da substância. No caso da HPMC, os grupos hidroxil são substituídos por hidroxipropil e metil, como mostrado na figura 8 (BAJWA, 2009). Existem hoje 3 principais tipos de HPMC descritos pela USP (*United States Pharmacopeia*), classificados de acordo com o grau substituição e de polimerização, sendo eles E, F e K (SILVA, 2008). A hipromelose também

apresenta-se sob diferentes graus de viscosidade, de modo que é de grande interesse farmacêutico o controle da sua viscosidade através de ajustes na temperatura, os quais possibilitam a transição da sua estrutura cristalina de solução para gel, processo conhecido como transição sol-gel (SARKAR, 1979).

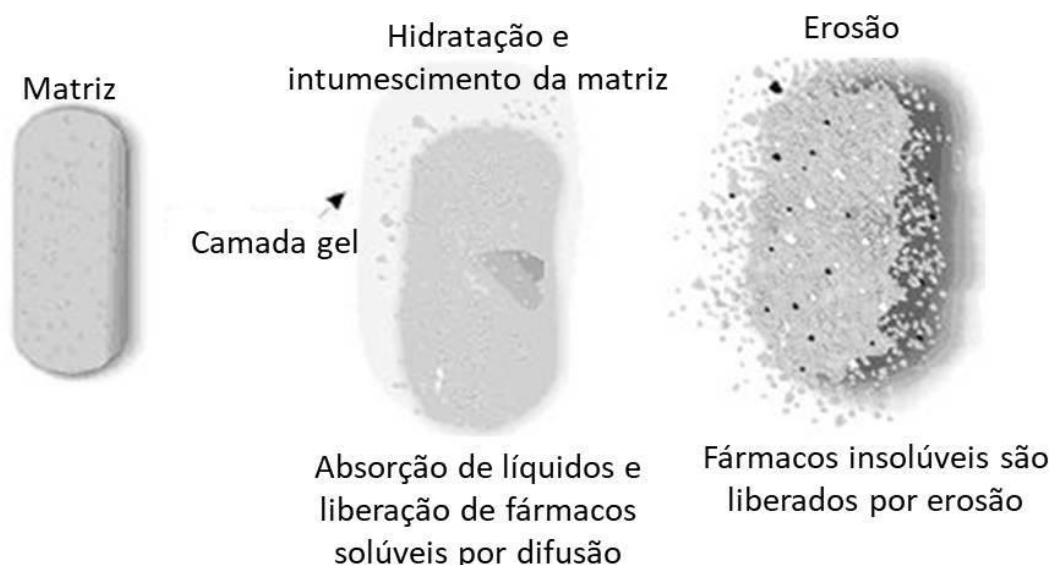
**Figura 8 – Estruturas químicas da (a) celulose natural e (b) hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)**



Fonte: (SILVA, 2008).

Os sistemas matriciais hidrofílicos também são chamados de matrizes solúveis e intumescíveis, sendo que no caso da HPMC, o intumescimento do polímero aumenta o seu volume hidrodinâmico e expõe os seus grupos hidrofóbicos, ao redor dos quais são formadas redes de moléculas de água que levam à erosão do polímero, como elucidado na figura 9 (ACEVEDO et al., 2014).

**Figura 9 – Mecanismos de liberação de fármaco de sistema matricial hidrofílico**



Fonte: (LYRA, 2007)

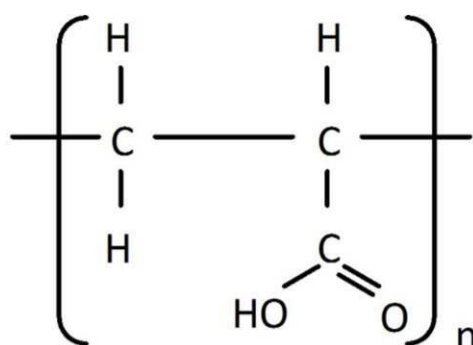
A hipromelose, em especial a HPMC K100, é bastante utilizada como matriz hidrofílica em sistemas de liberação controlada, de modo que o seu uso em sistemas particulados para a veiculação de fármacos, como as microesferas, já é bem descrito na literatura. A identificação dos diferentes *grades* de HPMC é composta por letras, que são as designações dos produtos agrupados em classes conforme suas propriedades, e por números, que correspondem à viscosidade média em cP de uma solução desse polímero, em uma concentração de 2% p/p a 20°C. (RAY, 2009; BASHIR, 2013; RAUT, 2015; UDDIN, 2013).

#### 1.3.4 Carbopois

Os carbopois, também chamados de carbômeros, são polímeros sintéticos derivados do ácido acrílico, de alto peso molecular e caráter aniônico, podendo apresentar ligações cruzadas com éteres de polialquileno e divinil glicol. A estrutura química geral dos carbopois está representada na figura 10. São materiais essencialmente não tóxicos e não irritantes com nenhuma evidência de hipersensibilidade em humanos decorrente do seu uso tópico (DAS, 2013). A sua aplicabilidade engloba desde a área cosmética até a farmacêutica, sendo os carbopois comerciais 934 e

940 os mais utilizados. Esses podem atuar como agente estabilizante, emulsificante e espessante devido à sua capacidade de formar redes de ligações cruzadas entre suas cadeias poliméricas em soluções aquosas (KIM, 2003).

**Figura 10 – Estrutura química geral dos carbopois**



As propriedades reológicas dos carbopois são bastante investigadas, uma vez que eles apresentam-se com propriedade viscoelástica quando dispersos ao invés de se dissolverem na água, além de serem passíveis de modificarem a sua viscosidade pelo simples ajuste da força iônica do meio (KIM, 2003). O ajuste do pH com uma base inorgânica, como o hidróxido de sódio, ou uma amina, como a trietanolamina, neutraliza os grupos ácidos do carbopol, o que provoca a reticulação das suas cadeias poliméricas, transformando-o em gel. Esse processo, chamado de transição sol-gel, ocorre em pH superior ao pKa do carbopol, que é em torno de 5,5 (LIN, 2000). Assim, a reticulação do carbopol em sistemas de liberação de fármacos faz-se útil quando a intenção é aumentar a resistência polimérica e retardar o processo de liberação do fármaco.

Os carbopois, quando em contato com a água, rapidamente a absorvem, hidratam-se e ficam intumescidos (CHAWLA, 2012), e é por meio desse processo que os fármacos se difundem nos sistemas de liberação controlada à base de matrizes hidrofílicas, como os carbopois. A velocidade de penetração da água na matriz gelificada condiciona o modo de liberação do fármaco, de modo que quando esse processo excede um valor crítico de concentração (concentração na qual as interações entre a água e o polímero aumentam com conseqüente redução das

interações polímero-polímero), as cadeias poliméricas começam a se separar, dando espaço à difusão do fármaco (LOPES, 2005).

#### 1.4 O uso de radiotraçadores com $^{99m}\text{Tc}$ em estudos *in vivo*

A radiomarcagem com isótopos radioativos permite a determinação, em tempo real, da biodistribuição do complexo fármaco-radioisótopo (SNEHALATA, 2008) e, portanto, constitui uma importante ferramenta no estudo de parâmetros farmacocinéticos, uma vez que permite a visualização direta e quantificação do fármaco *in vivo*. O tecnécio metaestável ( $^{99m}\text{Tc}$ ) é o radioisótopo mais utilizado nesse tipo de processo devido às suas características físico-químicas e nucleares, que o tornam ideal para um radiotraçador, como emissão gama de baixa energia (140 keV) e meia-vida curta (6 h), oferecendo um baixo risco de exposição à radiação, além de ser relativamente acessível (FERNANDES, 2015; DE BARROS, 2013; YANG, 2003).

O  $^{99m}\text{Tc}$  é um metal de transição da família VII B e tem número de atômico 43, podendo existir nos estados de oxidação de -1 a +7, sendo que os estados +4 e +7 são os mais estáveis e apresentam-se nos óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos. O  $^{99m}\text{Tc}$  é obtido a partir de um gerador de molibidênio na forma de pertecnetato de sódio ( $^{99m}\text{Tc-NaTcO}_4$ ), sendo que o íon  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  é quimicamente inerte. Assim, é necessária a redução do  $^{99m}\text{Tc} +7$  para um estado de oxidação mais baixo, geralmente +4, pela ação de um agente redutor, sendo o cloreto estano (SnCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O) o mais utilizado no preparo de compostos radiomarcados com  $^{99m}\text{Tc}$ . Por se tratar de uma espécie deficiente de elétrons, o  $^{99m}\text{Tc}$  é capaz de formar complexos com átomos ou grupos funcionais doadores de elétrons, como aminas, ácidos carboxílicos e grupos fosfato. Por ser quimicamente instável em meio aquoso, o  $^{99m}\text{Tc}$  pode apresentar-se na forma de sal,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ; além disso, quando o processo de radiomarcagem é ineficiente, isto é, o  $^{99m}\text{Tc}$  foi reduzido mas não se ligou à molécula de interesse, ele pode formar espécies colodais, como o TcO<sub>2</sub>. Ambas as espécies descritas,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$  constituem impurezas radioquímicas decorrentes do processo de radiomarcagem e devem ser quantificadas e mantidas em níveis baixos (somatório das duas impurezas deve ser inferior a 10%) na amostra (BRABAND, 2014; PAPAGIANNPOULOU, 2017).

As características químicas do  $^{99m}\text{Tc}$  levaram ao desenvolvimento de diversos radiofármacos e radiotraçadores adequados para o diagnóstico de inúmeras doenças, uma vez que eles se distribuem após administração sistêmica e acumulam-se nos órgãos e tecidos de interesse. Ainda, devido a tais características, a determinação de parâmetros como biodistribuição, depuração e tempo de meia-vida de um fármaco ou de uma partícula, por exemplo, torna-se possível (PAPPANGIUPOLOU). Aliada à radiomarcção de compostos com o  $^{99m}\text{Tc}$ , a cintilografia constitui uma importante ferramenta de imagem que contribui para o estabelecimento cada vez maior da medicina nuclear na área de diagnóstico (IQBAR 2017).

Diante do exposto, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada do cidofovir para o tratamento da papilomatose laríngea recorrente, visto que se trata de uma doença até então sem cura e de elevado impacto social, cujo tratamento apresenta limitações em decorrência do rápido extravasamento do CDV do local de ação. O PLGA, a HPMC e o carbopol são polímeros biodegradáveis já bem estabelecidos no desenvolvimento de sistemas de liberação, como as microesferas poliméricas. Além disso, a radiomarcção dos sistemas poliméricos e do próprio fármaco possibilita acompanhar o comportamento de ambos no organismo, de modo a estabelecer estratégias para melhor modular a liberação do CDV e prolongar o seu tempo de ação, aumentando o intervalo entre as administrações no tratamento e assim minimizar o desconforto do paciente.



**2 CAPÍTULO I: Desenvolvimento do radiotraçador  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV e avaliação *in vitro* e *in vivo***

---

## 2.1 OBJETIVOS

### 2.1.1 Objetivo Geral

Preparar o radiotraçador  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV de forma estável para os estudos em animais.

### 2.1.2 Objetivos Específicos

- 2.1.3 Radiomarcado o CDV com  $^{99m}\text{Tc}$  e determinar a pureza radioquímica por meio da quantificação das impurezas  $^{99m}\text{TcO}_4$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$ .
- 2.1.4 Determinar a estabilidade de marcação do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em solução salina e em plasma murino.
- 2.1.5 Determinar a ligação do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV a proteínas plasmáticas.
- 2.1.6 Determinar a depuração plasmática do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em camundongos saudáveis.
- 2.1.7 Realizar estudos de biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em camundongos saudáveis.
- 2.1.8 Obter imagens cintilográficas do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em camundongos saudáveis.

## RADIOMARCAÇÃO DO CDV E REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS *IN VITRO*

### 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.2.1 Materiais

Cidofovir hidratado (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);  $^{99m}\text{Tc}$  foi obtido de um gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  à base de alumina. Todos os reagentes, incluindo o  $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Camundongos Swiss fêmeas de 4 a 6 semanas de idade (CEBIO-UFMG, Belo Horizonte, Brasil). Todos os estudos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o nº 125/2017 (Anexo II).

#### 2.2.2 Métodos

##### 2.2.2.1 Radiomarcção do CDV e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade

Para o processo de radiomarcção, 1,0 mg de CDV foi solubilizado em 300  $\mu\text{L}$  de solução salina a 0,9% (p/v) em um frasco de penicilina. Em seguida, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) em HCl a 0,25 M foi adicionada à solução salina contendo CDV e o pH foi ajustado para 7,0 utilizando-se solução de NaOH 1 M. O frasco de penicilina foi então submetido à vácuo para receber uma alíquota de 0,1 mL de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  (37 MBq), de modo a não permitir a oxidação do  $^{99m}\text{Tc}$  pelo oxigênio do ar. A solução final foi mantida em temperatura ambiente por 15 min para completar o processo de radiomarcção (FERNANDES et al., 2015).

A eficiência da radiomarcção foi avaliada pela quantificação da pureza radioquímica em cromatografia delgada (CCD) em fitas de sílica gel, como fase estacionária, e acetona como eluente.  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  livre apresenta Rf 1 enquanto os demais constituintes ( $^{99m}\text{TcO}_2$  e  $^{99m}\text{Tc-CDV}$ ) apresentam Rf próximos a 0. Dessa forma, é possível isolar o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  livre na parte superior da fita, mantendo  $^{99m}\text{TcO}_2$  e  $^{99m}\text{Tc-CDV}$  na parte inferior. A fita foi, então, cortada ao meio e a radioatividade contida em cada parte determinada em contador gama (Wallac Wizard 1470-020

Gamma Counter; PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). O percentual de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  livre foi determinado segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{TcO}_4^- = \frac{\text{Contador Gama do Filtrado}}{\text{Contador Gama da Solução Original}} \times 100$$

Para a quantificação e remoção do  $^{99m}\text{TcO}_2$ , a solução contendo o produto radiomarcado foi filtrada em filtro 0,22  $\mu\text{m}$ . Para determinação do teor de  $^{99m}\text{TcO}_2$ , tanto o filtro quanto a solução filtrada foram levados ao contador gama e o teor foi calculado segundo a fórmula (FERNANDES et al., 2015):

$$\% \text{TcO}_2 = \frac{\text{Contador Gama do Filtro}}{\text{Contador Gama da Solução Original}} \times 100$$

A pureza radioquímica foi determinada pelo somatório das impurezas  $\text{TcO}_4^-$  e  $\text{TcO}_2$ , de modo que é considerada como uma marcação eficiente aquela que apresenta um teor de impureza menor ou igual a 10%.

#### **2.2.2.2 Determinação da estabilidade de marcação do CDV em solução salina e em plasma**

A CCD também foi utilizada para estimar a estabilidade do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV na presença de solução salina 0,9% (p/v) e plasma de camundongo. Para a estabilidade em salina, a solução radiomarcada foi mantida em temperatura ambiente e a estabilidade radioquímica foi determinada em amostras coletadas nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 h após a incubação. Já para a estabilidade em plasma, 90  $\mu\text{L}$  da solução de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV foi incubada, sob agitação, a 37°C com 1,0 mL de plasma fresco de camundongo. A estabilidade radioquímica foi também determinada e amostras coletadas em 1, 2, 4, 6 e 24 h após a incubação. Todas as amostras coletadas foram eluídas em CCD e as fitas de sílica gel foram levadas ao contador gama para quantificação do tecnécio-99m livre, ou seja, aquele que se dissociou da molécula de CDV.

### **2.2.2.3 Determinação da ligação do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV a proteínas plasmáticas**

O teor de ligação a proteínas plasmáticas foi estimado pelo método da precipitação de proteína. Uma alíquota de 45  $\mu\text{L}$  de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV foi adicionada a cada um dos 3 frascos de penicilina contendo 500  $\mu\text{L}$  de plasma fresco de camundongo e EDTA como agente anticoagulante. Os frascos foram incubados a 37°C, sob agitação. Após transcorridos 30 min, 1 e 4 h do início da incubação, uma alíquota de 1,5 mL de acetonitrila foi adicionada em cada frasco, provocando a precipitação das proteínas plasmáticas. As amostras foram centrifugadas a 5000 xg por 3 min, e a radiação tanto do sobrenadante quanto do precipitado foram medidas em um contador gama. O percentual de ligação do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV às proteínas plasmáticas foi calculado segundo a equação:

$$\% \text{ Ligação a proteínas plasmáticas} = \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

## **ESTUDOS *IN VIVO***

### **2.2.2.4 Determinação do clearance plasmático do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV**

Para a realização desse experimento, camundongos Swiss fêmea (n=7) receberam injeção contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV (3,7 MBq) pela veia caudal. Em seguida, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (15 mg/kg) e ketamina (80 mg/kg) e uma pequena incisão foi realizada na parte distal da cauda para permitir a rápida coleta do sangue. Amostras de aproximadamente 20  $\mu\text{L}$  de sangue foram coletadas nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 min após a administração do radiofármaco. As amostras foram pesadas e a radiação medida em contador gama. A porcentagem da atividade injetada por grama (%ID/g) foi expressa como média  $\pm$  DP, sendo que os dados foram plotados em função do tempo. A análise do clearance plasmático foi realizada no GraphPad PRISM, software versão 5.00 (GraphPad Softwar Inc., La Jolla, California, EUA).

### **2.2.2.5 Determinação do perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV**

Para o estudo do perfil de biodistribuição, uma alíquota de 3,7 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV foi injetada pela veia caudal de camundongos Swiss fêmea (n=7). Após 1 e 4 h da administração, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (15 mg/kg) e ketamina (80 mg/kg) para posterior eutanásia e coleta dos órgãos. Sangue, fígado, baço, rins, estômago, intestino delgado, intestino grosso, pulmões, coração, tireoide, cérebro, músculo e osso foram removidos e colocados em tubos plásticos previamente pesados. A radioatividade dos órgãos foi medida em contador gama. Uma dose padrão contendo a mesma atividade injetada foi contada simultaneamente em um tubo separado, sendo definida como 100% de radioatividade. Os resultados foram expressos como porcentagem da dose injetada por grama de tecido (%ID/g).

### **2.2.2.6 Obtenção de imagens cintilográficas após a administração do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV**

A biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV foi avaliada, também, por meio de imagens cintilográficas obtidas em uma gama câmara (Mediso, Hungria). A cintilografia é uma técnica da medicina nuclear baseada na formação de imagens a partir da captação de radiação gama emitida por radiofármacos administrados sistemicamente que podem ser ou não direcionados a determinado órgão ou tecido. No caso do estudo de novos radiotraçadores, as imagens cintilográficas tornam-se bastante úteis para confirmar o perfil de distribuição de um radiofármaco que foi observado em um estudo de biodistribuição. Neste estudo, o objetivo não foi direcionar o radiotraçador  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV a um local específico no organismo, e sim verificar como ele se comporta e por quais órgãos e tecidos tem mais afinidade ao ser administrado sistemicamente.

Alíquotas de 3,7 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV foram injetadas pela veia caudal de camundongos Swiss fêmea (n=7). Os animais foram anestesiados, imobilizados em uma tábua de plástico e alocados em decúbito frontal sob colimador de uma gama câmara acoplada com um colimador de baixa energia e alta resolução. As imagens foram adquiridas 1 e 4 h após as injeções, usando uma matriz de dimensões

256x256x16, com uma janela de energia de 20% em 140 Kev por um período de 300s cada.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Radiomarcção do CDV e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade

Por ser um radionuclídeo deficiente de elétrons, o  $^{99m}\text{Tc}$  complexa-se facilmente com compostos que apresentam em sua estrutura grupos doadores de elétrons, formando ligações covalentes. O CDV apresenta diferentes grupos funcionais que atendem a esse requisito, como  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{O}-$  e  $-\text{POOH}$  e, portanto, a complexação entre o CDV e o  $^{99m}\text{Tc}$  ocorre facilmente.

A fim de determinar as melhores condições do processo de radiomarcção do CDV, foram realizados testes variando-se algumas das condições mais críticas, como o volume da solução de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , que é o agente redutor do  $^{99m}\text{Tc}$  e que permite a sua complexação com compostos doadores de elétrons, e o pH do meio. As condições testadas, bem como as respectivas purezas radioquímicas são apresentadas nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1 – Variação do volume da solução de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  para otimização da radiomarcção do cidofovir**

Condições	Volume da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	pH do meio	% $\text{TcO}_4$
Condição 1	50	7	1,43
Condição 2	100	7	0,85
Condição 3	200	7	6,95

**Tabela 2 – Variação do pH para otimização da radiomarcção do cidofovir**

Condições	Volume da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	pH do meio	% $\text{TcO}_4$
Condição 4	100	5	3,21
Condição 5	100	7	2,83
Condição 6	100	9	4,37

A melhor condição do processo de radiomarcagem é definida como aquela que apresenta menor teor de  $^{99m}\text{TcO}_4$ , uma vez que essa impureza representa o tecnécio que não foi reduzido e, portanto, não conseguiu complexar-se ao CDV. Assim, a condição ideal para a radiomarcagem do CDV, como mostrado na tabela, envolve a junção das condições 2 e 5, que consiste no uso de 100  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em pH igual a 7,0 (FERNANDES et al., 2015).

A partir da condição definida, procedeu-se com a quantificação da impureza  $^{99m}\text{TcO}_2$ , que representa o tecnécio que foi hidrolisado. A solução do radiofármaco foi filtrada em filtro 0,22  $\mu\text{m}$ , com o auxílio de uma seringa, de modo a reter todo o  $^{99m}\text{TcO}_2$  no filtro e purificar a amostra. Após a contagem da radiação em contador gama, obteve-se um teor médio de  $^{99m}\text{TcO}_2$  de  $6,26 \pm 0,2\%$ .

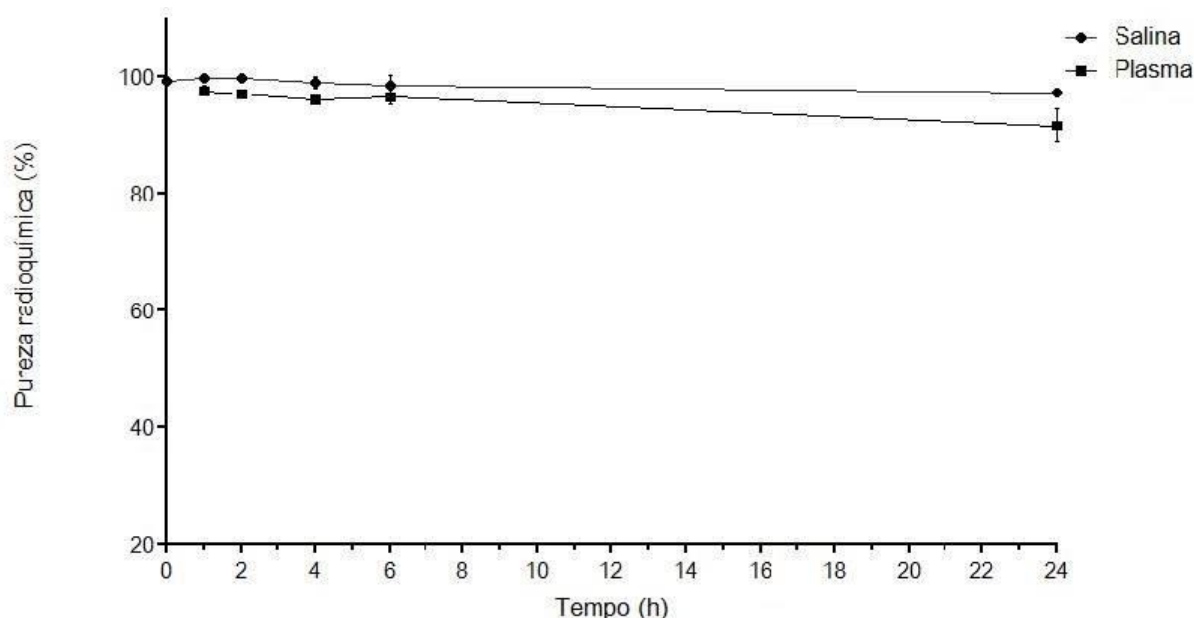
Considera-se como satisfatório o processo de radiomarcagem quando a soma das impurezas ( $^{99m}\text{TcO}_4 + ^{99m}\text{TcO}_2$ ) é menor ou igual a 10%. De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a radiomarcagem do CDV com  $^{99m}\text{Tc}$  foi eficiente.

### **2.3.2 Determinação da estabilidade de marcação do CDV em solução salina e em plasma**

Uma vez determinadas as condições ótimas de marcação do CDV, buscou-se estimar a estabilidade do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV na presença de solução salina 0,9% (p/v) e de plasma de camundongo, por CCD. A marcação do CDV em salina mostrou-se ligeiramente mais estável em comparação ao plasma, entretanto, é possível afirmar que  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV permanece estável, em ambos os meios, por até 24 h, como mostrado na figura 11.



**Figura 11 – Estabilidade *in vitro* do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em função do tempo na presença de salina, em temperatura ambiente, e na presença de plasma de camundongo, a 37°C**



O CDV é um análogo de nucleosídeo acíclico fosfonato, o que significa que o grupo fosfonato está diretamente ligado ao análogo de nucleosídeo, resultando em uma ligação do tipo éter fosfometil, o que confere resistência às esterases (ANDREI; SNOECK, 2010). A estabilidade da radiomarcagem do CDV já era quimicamente prevista, uma vez que as características apresentadas são responsáveis por garantir a integridade da molécula, pois os grupos fosfonatos são comumente quelados ao  $^{99m}\text{Tc}$  (SAEED et al., 2017) e, assim, garante-se que o grupo ao qual o  $^{99m}\text{Tc}$  encontra-se ligado não é hidrolisado, de modo que o rastreamento do  $^{99m}\text{Tc}$  implica no rastreamento fiel da molécula de CDV.

### **2.3.3 Determinação da ligação do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV a proteínas plasmáticas**

A ligação entre fármaco e proteínas plasmáticas é fator determinante não só na distribuição e eliminação do fármaco, como também na sua ação farmacológica, de modo que apenas o fármaco livre é capaz de transpor as membranas citoplasmáticas, interagir com proteínas de membrana e se ligar a proteínas livres circulantes (MCCALLUM et al., 2015).

Uma das formas de se avaliar a ligação de um fármaco às proteínas plasmáticas é pelo método de precipitação de proteína, que consiste na adição de um solvente orgânico no plasma, provocando a precipitação das proteínas plasmáticas devido à sua baixa solubilidade em solventes orgânicos. Apesar de ser um método não seletivo, com a marcação do fármaco com um isótopo radioativo, é possível verificar o fármaco total que se encontra precipitado e, portanto, quantificar o teor de fármaco que está ligado às proteínas plasmáticas.

Foi encontrado um elevado teor de ligação do complexo  $^{99m}\text{Tc-CDV}$  às proteínas plasmáticas. Em apenas 30 min após a incubação da solução do radiofármaco com o plasma,  $45,7 \pm 1,5\%$  do  $^{99m}\text{Tc-CDV}$  estava ligado às proteínas. Após 1 h, alcançou-se  $90,1 \pm 0,8\%$  de ligação, e este alto valor se manteve até 4 h de incubação ( $91,1 \pm 1,0\%$ ).

Ao contrário do que relatam dados publicados anteriormente, nos quais encontram-se descritas ligações do CDV às proteínas plasmáticas menores que 10,0% (CLARKE'S ANALYSIS OF DRUGS AND POISONS) e menores que 0,5% (CUNDY et al., 1995), no presente estudo foram encontrados níveis bastante elevados de ligação *in vitro* do complexo  $^{99m}\text{Tc-CDV}$  às proteínas plasmáticas. Ainda assim, tal resultado pode explicar a meia-vida relativamente longa do CDV e marcante captação sanguínea do  $^{99m}\text{Tc-CDV}$  observada no estudo de biodistribuição, principalmente 1 h após a administração intravenosa do radiofármaco.

Outro fator que poderia explicar a diferença entre os nossos resultados e os dados encontrados na literatura pode estar atribuído ao fato de que, nesse estudo, as avaliações foram realizadas com o complexo  $^{99m}\text{Tc-CDV}$ , e não com o CDV somente, ou seja, a ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  ao CDV pode ter alterado algumas das características observadas para o fármaco puro, inclusive aumentando a afinidade do CDV pelas proteínas plasmáticas.

## ESTUDOS *IN VIVO*

A farmacocinética de uma substância é definida como a sua distribuição temporal e espacial em um sistema, sendo o resultado de diversos eventos complexos, como a entrada dessa substância em um sistema e a sua distribuição, implicando na dinâmica circulatória, o transporte para dentro e fora das células e a eliminação, a qual geralmente necessita de transformações bioquímicas. Dentre os diversos eventos avaliados em um estudo farmacocinético encontram-se a depuração plasmática e a biodistribuição do composto em questão (FOSTER, 2007). A depuração plasmática é uma grandeza que relaciona a velocidade de eliminação e a concentração plasmática de uma substância, isto é, representa o volume de plasma livre de uma substância por unidade de tempo. Já a biodistribuição avalia a forma como o composto administrado sai da corrente sanguínea e perfunde pelos órgãos e quais os fatores que apresentam influência direta sobre tal comportamento. Nesse contexto, a cintilografia é empregada para confirmar, por meio de imagens, o perfil de biodistribuição obtido após administração intravenosa de um radiomarcador.

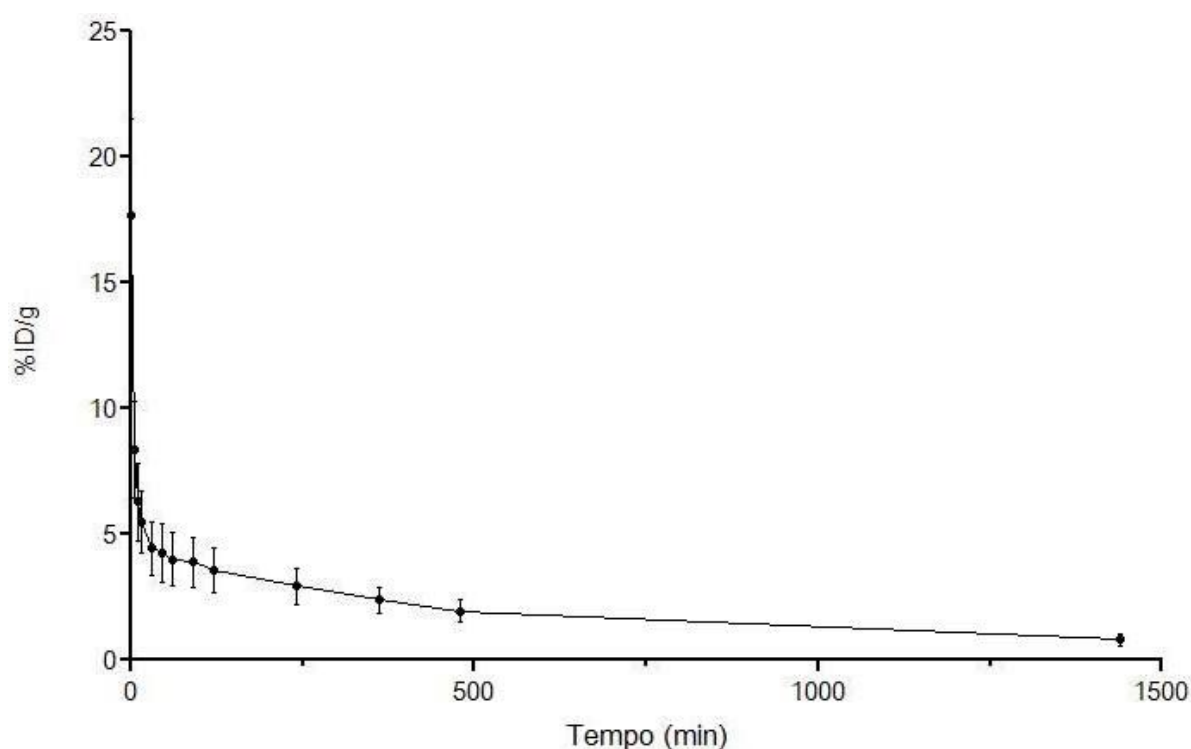
### **2.3.4 Determinação do clearance plasmático do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV**

O *clearance* é o volume de plasma a partir do qual uma substância pode ser totalmente depurada e depende de alguns fatores como concentração sérica do fármaco em questão, da taxa de filtração glomerular e do fluxo plasmático renal. Além disso, por meio de um estudo de depuração plasmática, é possível determinar também o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de determinada substância, isto é, o tempo gasto para que a sua concentração plasmática ou quantidade no organismo seja reduzida a 50% (GOODMAN, 2010). O clearance e o  $t_{1/2}$  são grandezas inversamente proporcionais: quanto menor o  $t_{1/2}$ , maior o clearance, sendo que esse foi o perfil observado no estudo da depuração do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV.

O clearance plasmático do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV foi avaliado após a injeção do complexo pela veia caudal dos camundongos. Os dados obtidos, que foram plotados em gráfico, como apresentado na figura 12, mostram que  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV apresenta uma depuração longa e os seus níveis plasmáticos decaem de forma bifásica, apresentando um

tempo de meia-vida curto, conhecido como fase de distribuição ( $\alpha$ ), de 2,3 min e um tempo de meia-vida longo, conhecido como fase de redistribuição ou eliminação ( $\beta$ ), de 227,1 min.

**Figura 12 – Clearance plasmático do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em camundongos SWISS fêmea. Os dados representam a porcentagem média (n=7) da dose injetada de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV por grama de sangue,  $\pm$  DP da média**



Esses resultados estão de acordo com estudos já publicados, dentre os quais foi relatado um tempo de meia-vida longo de 5,8 h para o CDV (CARUSO BROWN et al., 2015).

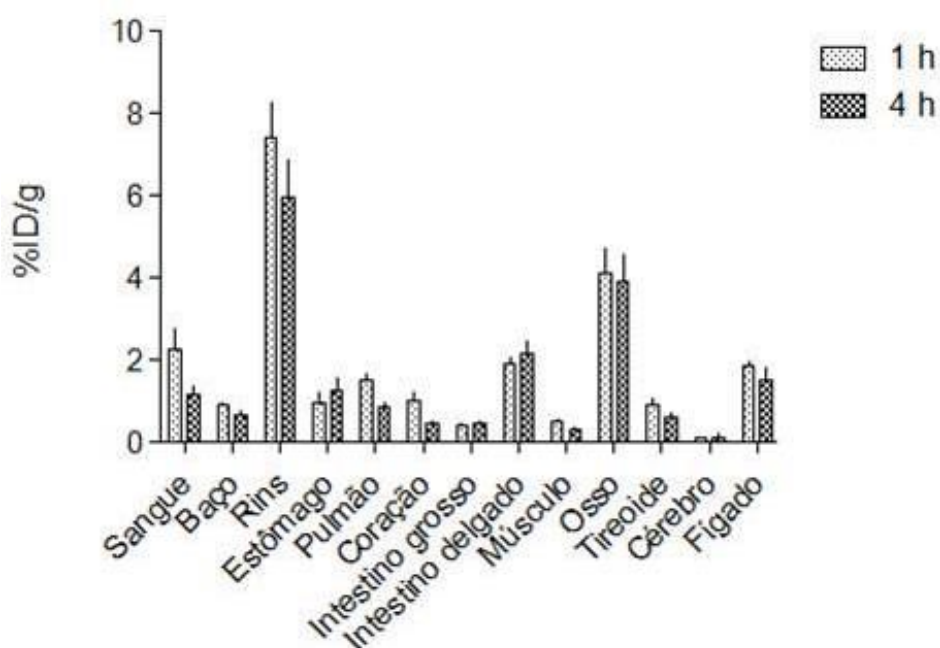
### **2.3.5 Determinação do perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV**

O perfil de biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV foi realizado com o intuito de rastrear o complexo após a sua administração intravenosa em camundongos saudáveis. A perfusão do radiofármaco pelos órgãos está intimamente relacionada com as características físico-químicas que ele apresenta, de modo que tais características ditam não só o perfil de distribuição do complexo no organismo, como também interferem diretamente nos outros processos avaliados *in vivo*, como a depuração, o

tempo de meia-vida, a ligação às proteínas plasmáticas e as vias de eliminação do radiofármaco.

Após a administração do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV, parte dos animais ( $n=7$ ) foi eutanasiada para remoção dos órgãos no tempo de 1 h, e os outros animais ( $n=7$ ) foram eutanasiados no tempo de 4 h. O período de 1 h é suficiente para que um fármaco administrado sistemicamente, e que não seja metabolizado e eliminado muito rapidamente, seja distribuído por todo o organismo e, por isso, a análise de 1 h fornece uma visão geral do comportamento do fármaco. O período de 4 h corresponde, aproximadamente, ao  $t_{1/2}$  longo encontrado para o  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV, que foi de 227,1 min. Assim, transcorrido esse tempo, é possível acompanhar o que acontece com o radiofármaco após a sua distribuição inicial, isto é, verificar se houve alteração no perfil de distribuição em relação ao tempo de 1 h, em quais órgãos houve maior depuração ou acúmulo do complexo, assim como avaliar as rotas de eliminação do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV. A biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV nos órgãos avaliados dos animais, nos tempos de 1 e 4 h, está demonstrada na figura 13.

**Figura 13 – Perfil de biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV após a injeção intravenosa pela veia caudal de camundongos Swiss fêmeas. Os dados correspondem à porcentagem média ( $n=7$ ) da dose injetada de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV por grama de tecido  $\pm$  DP da média**



Tanto no tempo de 1 h quanto no tempo de 4 h após a administração do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV, a captação mais alta do radiofármaco foi observada nos rins, como já era esperado, devido à sua alta hidrofília, que é atribuída ao caráter polar do fármaco. Além disso, esse perfil indica a via renal como a principal forma de excreção do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV, e pode estar diretamente relacionada com a elevada nefrotoxicidade do CDV, causada por danos nos túbulos proximais renais, o que já está bem descrito na literatura (MARERI et al., 2016)(BHADRI; LEE-HORN; SHAW, 2009) (YUSUF et al., 2006).

Uma elevada captação foi também observada nos ossos. Os ossos são compostos por diferentes íons inorgânicos, principalmente cálcio e fosfato e, portanto, apresentam afinidade por compostos que apresentam esses íons. Ainda que o CDV não possua um grupo fosfato na sua estrutura química, ele apresenta um grupo fosfonato, que é quimicamente bastante semelhante ao fosfato, o que explica a elevada captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV pelos ossos. A afinidade entre os ossos e compostos que apresentam grupo fosfonato já foi bem elucidada na literatura e, inclusive, pode ser demonstrada pelo uso do MDP (metoxi difosfonato), um radiofármaco utilizado para o diagnóstico de metástase óssea (SAEED et al., 2017).

É importante mencionar que o intestino delgado e o fígado mostraram captação moderada, sugerindo contribuição também da rota intestinal na metabolização e eliminação do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV.

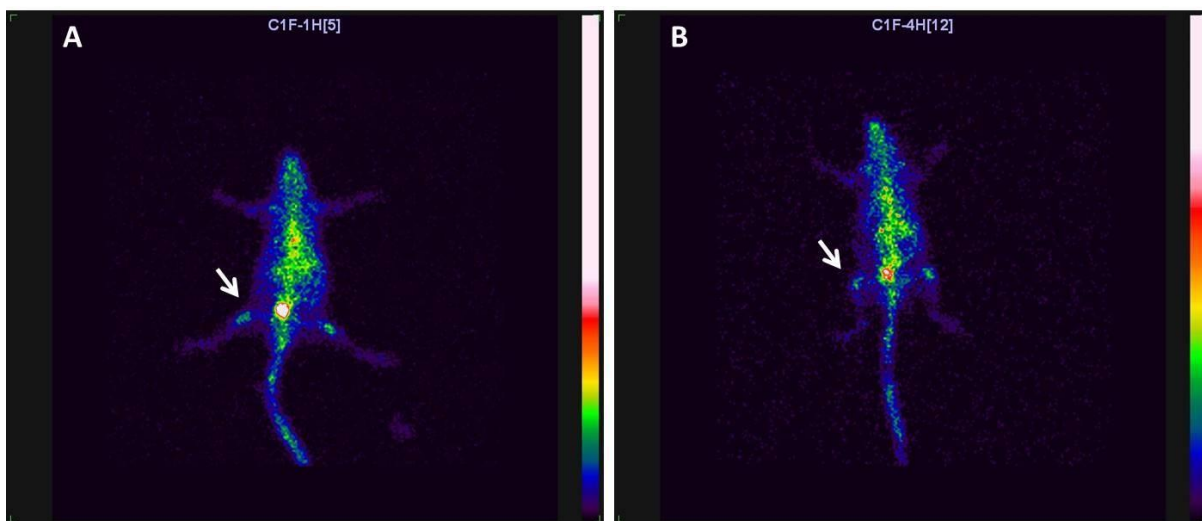
De forma geral, a biodistribuição do complexo manteve o mesmo perfil em 1 e 4 h. A maior diferença pode ser notada no sangue, que sofreu a maior depuração do radiofármaco no tempo de 4 h, o que pode ser explicado pela própria perfusão e distribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV pelos tecidos.

### **2.3.6 Obtenção de imagens cintilográficas após a administração do $^{99m}\text{Tc}$ -CDV**

As imagens cintilográficas exibiram um perfil similar ao apresentado pelo estudo de biodistribuição, como mostrado na figura 14. A imagem de 1 h mostra um sinal bastante intenso na região abdominal, como resultado da elevada captação pelos rins, intestino delgado e fígado. No tempo de 4 h, a intensidade do sinal diminui

devido à depuração do radiofármaco no organismo. O sinal emitido pela captação óssea está presente em ambas as imagens e é indicado por setas na figura 13.

**Figura 14 – Imagens cintilográficas obtidas em 1 (A) e 4 h (B) após a injeção de  $^{99m}\text{Tc}$ -CDV em camundongos sadios. As setas indicam a captação óssea do radiofármaco**



## 2.4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo fornecem novas perspectivas para o monitoramento do CDV em tempo real *in vivo* em diferentes modelos experimentais de modo a entender melhor o comportamento do fármaco. Além disso, o CDV ganhou bastante enfoque na área farmacêutica devido à sua aplicabilidade no tratamento de diversas infecções virais. Como resultado, muitos pesquisadores têm estudado diferentes formulações, nano e micropartículas, para melhorar a eficiência terapêutica do CDV, bem como reduzir os efeitos adversos decorrentes do seu uso (SANTOYO et al., 2002). A partir do uso do novo radiotraçador ( $^{99m}\text{Tc}$ -CDV) pode ser possível avaliar o perfil de liberação do CDV em diferentes formulações, além de comparar sistemas de liberação inovadores com os sistemas convencionais. Este trabalho, portanto, apresenta uma ferramenta promissora na avaliação do CDV em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

**3 CAPÍTULO II: Desenvolvimento e caracterização *in vitro* e *in vivo* de sistemas poliméricos para veiculação do CDV**

---



## **3.1 OBJETIVOS**

### **3.1.1 Objetivo Geral**

Desenvolver sistemas poliméricos biodegradáveis, contendo CDV, adequados para administração local nas pregas vocais para o tratamento da papilomatose laríngea recorrente.

### **3.1.2 Objetivos Específicos**

**3.1.3** Validar o método analítico para identificação e quantificação do cidofovir utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

**3.1.4** Desenvolver os sistemas poliméricos à base de PLGA 75:25 e da blenda composta por HPMC K100 e carbopol 940.

**3.1.5** Caracterizar os sistemas obtidos por meio das técnicas de análise térmica (termogravimetria, calorimetria diferencial exploratória e infravermelho), morfológica (MEV), tamanho das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação.

**3.1.6** Avaliar a citotoxicidade dos sistemas obtidos em modelo de membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha.

**3.1.7** Avaliar histologicamente a resposta inflamatória da prega vocal de coelho à presença dos sistemas poliméricos.

**3.1.8** Realizar a radiomarcagem dos sistemas poliméricos com  $^{99m}\text{Tc}$  e avaliar a eficiência do processo de marcação.

**3.1.9** Avaliar qualitativamente, em gama-câmara, a aderência dos sistemas poliméricos na mucosa das pregas vocais após a injeção local na laringe de coelhos.

**4 CAPÍTULO II, PARTE 1: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA  
QUANTIFICAÇÃO DO CDV POR CLAE**

---

## VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CIDOFOVIR

### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.1 Materiais

Cidofovir hidratado (massa molecular = 297,2 g/mol) – Sigma-Aldrich Ltda; São Paulo, Brasil; Poli (D,L-lático-co-glicólico) 75:25 [PLGA 75:25; viscosidade inerente (v.i) = 0.50 – 0.70 dl/g] Resomer<sup>®</sup> RG 755 S – Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co; Ingelheim, Alemanha; Methocel<sup>®</sup> K100 – LV premium USP ; carbopol 940 - Acofarma<sup>®</sup>; acetonitrila grau CLAE - Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil; fosfato de tetrabutílamônio – JT Baker<sup>®</sup> ; fosfato de sódio monobásico monohidratado – Sigma-Aldrich Ltda; água ultrafiltrada – Milli Q plus, Millipore<sup>®</sup>, EUA; Billerica, Estados Unidos.

#### 4.1.2 Métodos

A validação do método analítico para quantificação de cidofovir foi realizada em cromatógrafo líquido da Agilent<sup>®</sup> (Modelo 1260 *Infinity Series*, EUA) equipado com bomba modelo G1311B, injetor automático modelo G1329B, detector DAD (do inglês - *diode array detector*) modelo G4212B e com o *software* da Agilent<sup>®</sup> (Modelo *EZChrom Elite*, EUA). Foi utilizada uma coluna do tipo C-18, fase reversa, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro e com partículas de 5µm (Modelo Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18 endcapped, Merck, Alemanha).

O método foi adaptado de Santoyo e colaboradores (2002) e validado conforme as diretrizes da resolução RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além de serem encontrados métodos desenvolvidos por diferentes autores na literatura, o método para quantificação do CDV encontra-se disponível também na farmacopeia americana (USP) e, por isso, o método proposto neste trabalho foi validado apenas pelos seguintes ensaios: seletividade, linearidade da

faixa de trabalho, precisão intradia e precisão interdia. As condições cromatográficas e os parâmetros de adequabilidade do sistema estão relacionados nos quadros 2 e 3, respectivamente.

**Quadro 2 – Condições cromatográficas para validação do método de quantificação do cidofovir por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições utilizadas</b>
Fase móvel	Solução tampão* + ACN (97:3 v/v) pH= 6
Tipo de corrida	Isocrática
Tempo de corrida	15 min
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda de absorção	274 nm
Temperatura do forno	40°C
Pressão do sistema	~110 bar

\*Fosfato de tetrabutilamônio 1,5 mM + fosfato de sódio monobásico 3,5 mM

**Quadro 3 – Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos durante a validação do método de quantificação do cidofovir por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições obtidas</b>
Tempo de retenção do CDV	4,8 min
Pratos teóricos	1000
Assimetria	1,1
Pureza de pico	0,99 - 1,0

Foi preparada uma solução estoque de CDV em água na concentração de 1,0 mg/mL, a partir da qual foram realizadas as diluições subsequentes para preparo das amostras. A seletividade foi avaliada pela comparação dos picos obtidos da análise de uma amostra da fase móvel pura, solução de CDV 15,0µg/ mL (correspondente ao ponto de concentração 100% na curva de calibração), solução diluente (DCM) e solução de PLGA 75:25 0,09% p/v.

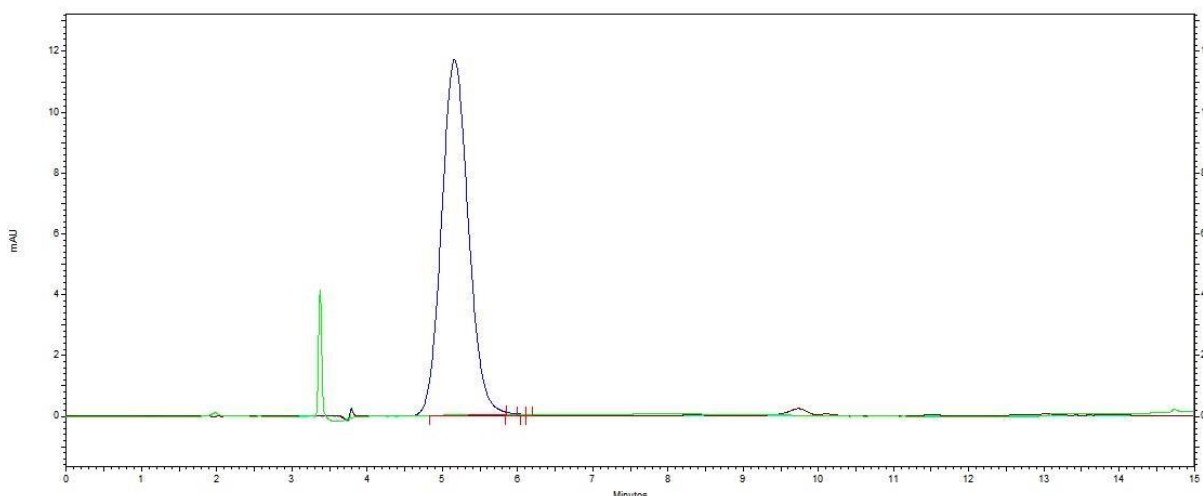
A construção da curva de calibração para determinação da linearidade foi realizada

pela análise de 5 concentrações igualmente intervaladas do analito, sendo elas 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0  $\mu\text{g/mL}$ . A partir dos resultados obtidos foram determinados o coeficiente de correlação linear ( $r$ ), interseção com o eixo Y e coeficiente angular (BRASIL, 2003).

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

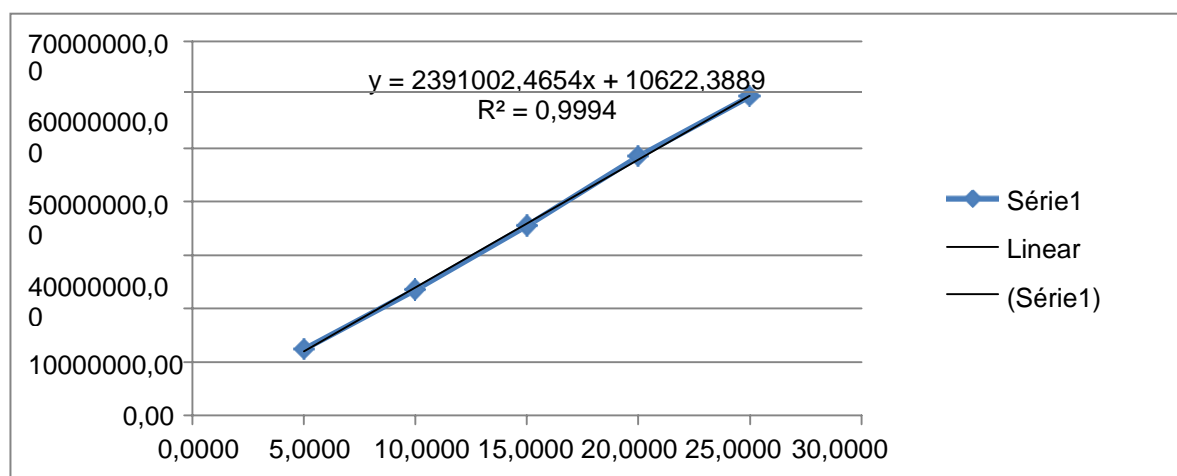
O cromatograma correspondente às análises de seletividade está exposto na figura 15. O método mostrou-se seletivo para o CDV, uma vez que, no comprimento de onda de absorção do CDV (274 nm), nenhuma das amostras analisadas apresentou interferentes no tempo de retenção do fármaco.

**Figura 15 – Sobreposição dos cromatogramas referentes ao cidofovir (azul), fase móvel (vermelho), diluente (verde) e ao ácido poli lático-co-glicólico(turquesa)**



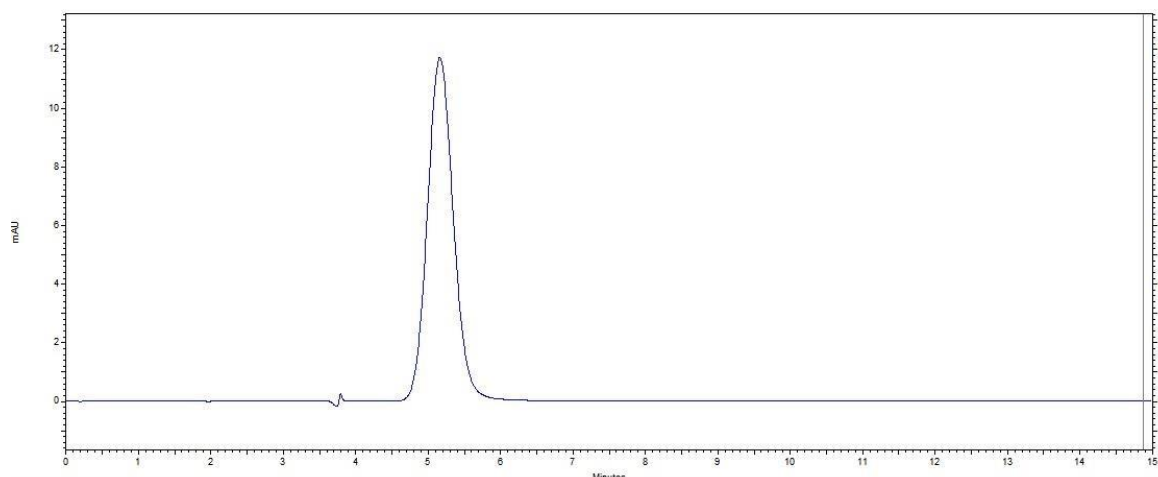
No parâmetro linearidade, realizou-se a análise de variância (ANOVA) e pode-se concluir que a regressão é estatisticamente significativa em nível de significância de 5% e que não há desvio de linearidade. O método demonstrou ser linear nas concentrações entre 5,0 e 25,0  $\mu\text{g/mL}$ . Foi aplicado o método dos mínimos quadrados ordinários, utilizando-se o software Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007, obtendo-se coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9994 e a equação da reta  $y = 2391002,4654 x + 10622,3889$ . A curva de calibração obtida pelo ensaio da linearidade está exposta na figura 16.

**Figura 16 – Curva de calibração obtida para o cidofovir no intervalo de 5,0 a 25,0 µg/mL**



No parâmetro precisão, a repetibilidade foi avaliada pela injeção das concentrações mínima, 100% e máxima, respectivamente 5,0, 15,0 e 25,0 µg/mL, em triplicata, totalizando 9 determinações. O mesmo procedimento foi adotado para precisão intermediária, contudo, as análises foram realizadas em dias diferentes. Os valores de DPR obtidos nas análises das precisões intradia e interdia foram iguais a 1,69% e 1,93%, respectivamente. Dessa forma, o método foi considerado preciso, uma vez que foram obtidos valores inferiores a 5% para as precisões intradia e interdia, conforme consta na RE 899 da ANVISA. O cromatograma do CDV na concentração de 15,0 µg/mL, obtido no teste da precisão e que corresponde às análises de doseamento da formulação, encontra-se na figura 17.

**Figura 17 – Cromatograma do cidofovir (15 µg/mL) referente à concentração de 100% da precisão**



### **4.3 CONCLUSÃO**

O método analítico validado mostrou-se seletivo, específico, preciso e linear, podendo-se concluir que ele é adequado para a quantificação do CDV nas MEs desenvolvidas.

**5 CAPÍTULO II, PARTE 2: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS**

---



## MICROESFERAS DE PLGA

### 5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.1.1 Materiais

Cidofovir hidratado (massa molecular = 297,2 g/mol) – Sigma-Aldrich Ltda; São Paulo, Brasil; Poli (D,L-lático-co-glicólico) 75:25 [PLGA 75:25; viscosidade inerente (v.i) = 0.50 – 0.70 dl/g] Resomer<sup>®</sup> RG 755 S – Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co; Ingelheim, Alemanha; acetonitrila grau CLAE - Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil; metanol; diclorometano; Tween<sup>®</sup> 80 - Neon; Spam<sup>®</sup> 60 – Sigma-Aldrich Ltda; fosfato de tetrabutylamônio – JT Baker; fosfato de sódio monobásico monohidratado – Sigma-Aldrich Ltda; água ultrafiltrada – Milli Q plus, Millipore<sup>®</sup>, EUA; Billerica, Estados Unidos; água destilada; ultraturrax; centrífuga; cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent; mastersizer 3000 laser diffraction particle size analyzer.

#### 5.1.2 Métodos

##### 5.1.2.1 Desenvolvimento de microesferas biodegradáveis à base de PLGA 75:25 brancas e contendo CDV

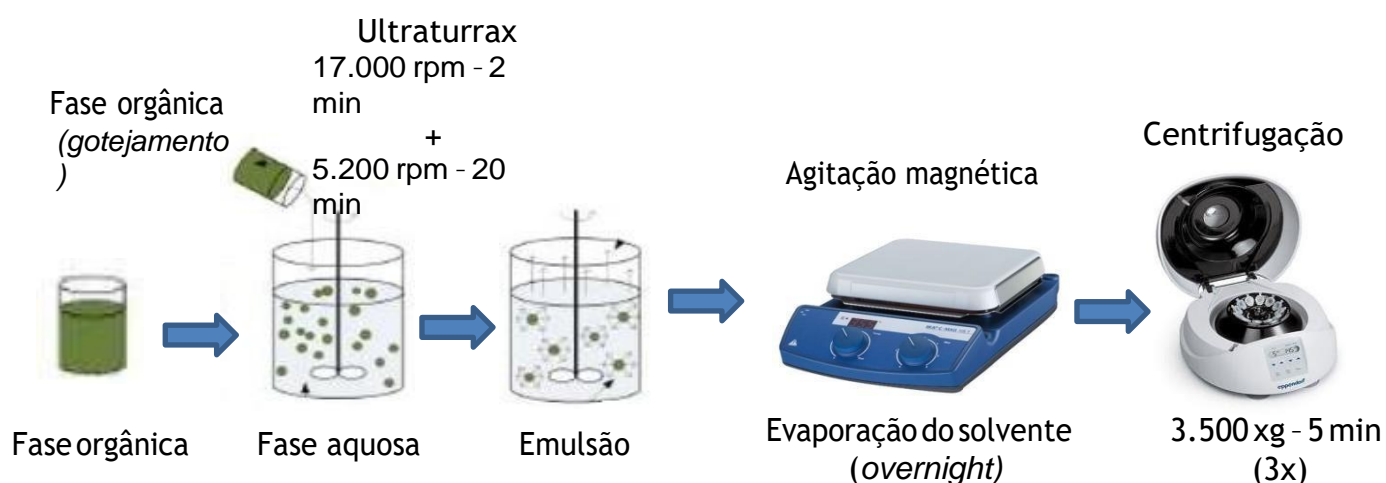
As microesferas (MEs) foram desenvolvidas pelo processo de formação de emulsão simples óleo em água (O/A) seguido pela evaporação do solvente. Para tanto, duas fases foram preparadas, sendo uma aquosa, composta por água destilada e tween<sup>®</sup> 80 (surfactante hidrofílico), e uma orgânica, composta por PLGA 75:25, diclorometano e spam<sup>®</sup> 60 (surfactante hidrofóbico), no caso da formulação branca. Para a incorporação do fármaco, o CDV foi acrescentado na fase aquosa devido à sua elevada hidrossolubilidade. São apresentadas no quadro 4 as proporções utilizadas de cada reagente para o preparo das formulações. Após o preparo das duas fases e completa solubilização dos componentes, a fase aquosa foi colocada sob agitação pelo Ultraturrax<sup>®</sup>, enquanto a fase orgânica era gotejada sobre a aquosa para formação da emulsão. Diferentes tempos de preparo e frequência de

agitação foram avaliados para determinar a condição ideal. As etapas do processo de obtenção das MEs e as condições ideais de preparo são apresentadas pelo fluxograma na figura 18. Uma vez pronta a emulsão, a formulação foi deixada sob agitação magnética por 24 h para completa evaporação do diclorometano. Para a recuperação das MEs, a amostra foi centrifugada a 3500 xg por 5 min e lavada com água destilada, por 3 vezes, para completa remoção do solvente e do excesso de surfactante. Após esse processo, as MEs foram ressuspensas em água destilada para armazenamento e posterior realização das análises de caracterização e quantificação.

**Quadro 4 – Composição, em porcentagem, de todos os componentes da formulação de microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA)**

<b>Constituintes</b>	<b>Fase orgânica</b>	<b>Concentração</b>	<b>Fase aquosa</b>	<b>Concentração</b>
<b>Solvente</b>	Diclorometano	-	Água destilada	-
<b>Polímero</b>	PLGA 75:25	0,09%	-	
<b>Surfactante hidrofílico</b>	-	-	Tween <sup>®</sup> 80	3,0%
<b>Surfactante hidrofóbico</b>	Span <sup>®</sup> 60	0,09%	-	-

**Figura 18 – Fluxograma contendo as condições ideais para o preparo das microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA)**



### 5.1.2.2 Distribuição do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das microesferas

Para a análise, as MEs brancas ressuspendidas em água destilada foram adicionadas ao equipamento. A quantidade de amostra ideal foi obtida quando o nível de obscuração do sistema, medido pelo equipamento, estava entre 8% e 10%. A distribuição de tamanho foi apresentada por gráfico e tabela contendo tamanhos correspondentes à média e mediana. O índice de polidispersão foi calculado segundo a fórmula 1.

$$\text{—————} \quad (1)$$

Na qual:

IP = índice de polidispersão

D90 = frequência de tamanho de 90% das partículas ( $\mu\text{m}$ )

D10 = frequência de tamanho de 10% das partículas ( $\mu\text{m}$ )

D50 = frequência de tamanho de 50% das partículas ( $\mu\text{m}$ )

Para a determinação do potencial zeta foi utilizado o equipamento Zetasizer<sup>®</sup> Nano ZS90, Malvern, o qual baseia-se na mobilidade forética das partículas. Cerca de 1 mL da amostra de MEs brancas foi colocado em uma célula capilar descartável à base de policarbonato, contendo eletrodos. O potencial zeta das MEs foi determinado logo após ressuspensão das partículas, a 25°C.

O pH da suspensão de MEs foi medido após a centrifugação da formulação e lavagem com água destilada para remoção do excesso de tensoativo. As medidas foram realizadas em triplicata, em pHmetro previamente calibrado, em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP.

### 5.1.2.3 Estudo da morfologia das MEs por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o emprego da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é possível obter imagens tridimensionais de grande aumento que fornecem informações

morfológicas do material analisado. Essa técnica baseia-se na incidência de um feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra, gerando sinais sob a forma de elétrons secundários, retroespalhados, raios-x característicos, fótons, dentre outros, que são direcionados a um detector, onde o sinal é ampliado para formar a imagem (KLAUSS, 2003).

Para a obtenção de partículas poliméricas, muitas vezes é empregada a liofilização da amostra como etapa final do processo, de modo a obter partículas completamente secas e com menor chance de degradação. Dessa forma, a fim de verificar e comparar a influência da liofilização na morfologia e integridade das MEs obtidas, foi preparado um lote de MEs brancas para análise, de modo que uma parte desse lote foi liofilizado e a outra parte foi deixada na forma de suspensão.

Os stubs utilizados na técnica de MEV foram pintados com tinta prata para aumentar a condutividade e potencializar a emissão dos elétrons secundários. Para a amostra em suspensão, foi colocada uma lamínula sobre o stub, na qual pingou-se uma gota da formulação, que foi deixada dentro de um dessecador até o momento da metalização do material, para completa evaporação da água. Já para a amostra liofilizada, colou-se um pedaço de fita dupla-face sobre a lamínula aderida ao stub. Assim, o pó obtido do processo de liofilização das MEs foi pulverizado sobre a fita. As amostras permaneceram por aproximadamente 4 dias dentro do dessecador, e depois passaram pela etapa de metalização, a qual foi realizada no equipamento Scancoat Six<sup>®</sup>. Uma camada condutora de ouro de 22,5 nm, sob atmosfera de argônio, recobriu as amostras, visando conferir condutividade à superfície das MEs, uma vez que o polímero PLGA não tem natureza condutora de elétrons. Por fim, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura para análise. Considerando-se que os polímeros, de modo geral, apresentam baixa resistência ao feixe de elétrons incidido, as condições de análise como corrente, voltagem, profundidade de campo e aumento tiveram que ser ajustadas para não degradar a amostra, e estão relacionadas no quadro 5.

As análises de MEV foram realizadas no CAPI – Centro de Aquisição de Processamento de Imagens, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, durante o curso da disciplina de Microscopia Eletrônica de Varredura ofertada pelo

Programa de Pós-graduação do ICB.

**Quadro 5 – Condições ótimas de análise das microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condição ótima de análise</b>
Modelo do microscópio	DSM 950
Corrente	80 $\mu$ A
Voltagem	4 kV
Profundidade de campo	18 mm
Aumentos	200, 500, 1000 e 3000 x

#### **5.1.2.4 Avaliação do teor de encapsulação do CDV nas MEs**

O teor de encapsulação do CDV representa a porcentagem de fármaco que foi encapsulada pelas MEs em relação à quantidade total adicionada à formulação. Essa análise foi realizada por CLAE, utilizando o método analítico previamente validado. Para o preparo da amostra, uma alíquota da suspensão de MEs recém preparada foi adicionada à uma solução de ACN e álcool isopropílico (1:1) para completa solubilização e abertura das partículas. Em seguida, foi realizada uma diluição da amostra, de modo que a concentração teórica de CDV estivesse dentro da curva de calibração obtida na validação do método. A solução final foi então filtrada em filtro Millex<sup>®</sup> 0,45  $\mu$ m e transferida para vial para posterior injeção no equipamento.

## **5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.2.1 Desenvolvimento das microesferas biodegradáveis à base de PLGA 75:25 brancas e contendo CDV**

A escolha do polímero que seria utilizado para o desenvolvimento das MEs baseou-se, principalmente, no seu perfil de biodegradabilidade e biocompatibilidade. O PLGA é uma das matrizes mais utilizadas para o carreamento de fármacos, sendo aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o uso em aplicações biomédicas por ser biodegradável e biocompatível (CHEN et al., 2013).

A biodegradabilidade é um fator de destaque na escolha de um polímero, uma vez que é desejável que um material introduzido no organismo seja capaz de ser depurado ou auto-degradado, sem a necessidade de intervenções externas para a sua retirada. A degradação do PLGA resulta na liberação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água, via ciclo de Krebs, que serão excretados na urina (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Assim, devido aos seus produtos de degradação, que são constitutivos do organismo, o PLGA torna-se, além de biodegradável, biocompatível, o que justifica o seu frequente uso na veiculação de fármacos em sistemas de liberação controlada. Além disso, o PLGA apresenta bastante versatilidade das suas propriedades de liberação associadas à modificação da sua composição, o que envolve variações na razão de ácido lático e ácido glicólico e também serve para identificar os diferentes tipos de PLGA. O PLGA 75:25 contém 75% de ácido lático e 25% de ácido glicólico e, considerando que a sua degradação e consequente liberação do fármaco encapsulado ocorre em aproximadamente 4 meses (FIALHO et al., 2003; LEE et al., 2010), ele foi o polímero de escolha para atender ao requisito de apresentar uma degradação intermediária dentre os diferentes tipos de PLGA existentes.

O diclorometano (DCM) foi o solvente de escolha devido à sua volatilidade e capacidade de dissolver diversos compostos orgânicos, o que o torna um solvente ideal para muitos processos químicos. O DCM é capaz de solubilizar completamente o PLGA, e por isso é bastante utilizado nos processos para produção de micro e nanopartículas à base de PLGA (CHENNAMANENI et al., 2013; RAMAZANI et al., 2016; TUNÇAY et al., 2000). Além disso, a elevada volatilidade desse solvente faz-se bastante útil, uma vez que o processo pelo qual as MEs foram produzidas envolve a evaporação do solvente e, no caso do DCM, esse processo ocorre naturalmente, sem a necessidade do uso de equipamentos rotaevaporadores.

Diferentes métodos já são bem descritos na literatura sobre a obtenção de microesferas poliméricas, sendo as técnicas de revestimentos, *spray-drying*, coacervação e emulsificação os principais métodos utilizados (SILVA et al., 2003). A escolha do método de emulsão simples do tipo O/A seguido pela evaporação do solvente para a obtenção das MEs de PLGA deu-se pela facilidade de reprodução, a

não utilização de equipamentos muito específicos e por ser o método mais utilizado na literatura (CHENNAMANENI et al., 2013; DUARTE BYRRO et al., 2009; MARTÍNEZ-SANCHO; HERRERO-VANRELL; NEGRO, 2006). De fato, tal método mostrou-se bastante simples de ser executado e eficaz, como ficou claro nos resultados obtidos pelas análises de caracterização que serão apresentados posteriormente.

Existem dois tipos principais de emulsão: simples e múltipla, de modo que o tipo é definido conforme a distribuição relativa das diferentes fases que compõem o sistema (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015). De modo geral, para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, como é o caso do CDV, em micropartículas de polímeros hidrofóbicos é utilizado o método de emulsificação múltipla, do tipo A/O/A. Contudo, além de ser um processo mais complexo e de difícil reprodutibilidade, as emulsões múltiplas possuem baixa estabilidade termodinâmica e, por isso, ao longo do tempo de armazenamento, ocorrem mudanças em suas estruturas que ocasionam perda dos componentes nelas encapsulados (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015). Ainda, outro fator limitante no uso das emulsões múltiplas reside no fato de que o volume da fase mais interna da emulsão, que é a fase aquosa na qual está presente o fármaco, está presente na ordem de microlitros, ou seja, é um volume muito pequeno para ser passível de ser reproduzido em uma provável escala industrial, de modo que, dados todos esses fatores em conjunto, a obtenção de MEs para encapsulação do CDV por esse método estaria, muito provavelmente, restrito à uma escala de bancada de laboratório. Devido a esses motivos, o método de escolha foi a emulsificação simples O/A para encapsulação do CDV.

Devido ao uso de um solvente orgânico durante o preparo das MEs, o DCM, é ideal que seja desenvolvido um método para detecção de solvente residual, pois o processo de evaporação por agitação mecânica pode não ser totalmente eficaz e suficiente para a completa remoção do DCM. Assim sendo, a análise da amostra por um método de detecção e quantificação de solventes residuais faz-se necessária para garantir que o solvente em questão esteja dentro do limite permitido. Entretanto, não houve disponibilidade para a realização desta etapa do projeto, ficando como perspectiva para complementações futuras.

### **5.2.2 Distribuição do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das MEs**

A medida da distribuição do tamanho de partícula é fundamental para avaliar o grau de uniformidade de uma amostra. De acordo com o índice de polidispersão de um sistema particulado, o qual avalia a variação de tamanho das partículas em torno de uma média, é possível classificar tal sistema como monodisperso, quando a distribuição do tamanho é homogênea, ou polidisperso, quando essa distribuição é heterogênea. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a determinação do tamanho médio de partículas micrométricas e do seu índice de polidispersão, como métodos cromatográficos por exclusão de tamanho, difração a laser, microscopia eletrônica e espalhamento de luz estático (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

Para determinar o tamanho e o índice de polidispersão das microesferas, foi utilizado o equipamento Mastersizer<sup>®</sup> 3000 Beckman Coulter, o qual baseia-se no espalhamento de luz estático. Essa técnica baseia-se no princípio de que a luz incidente, no caso o laser, interage com a amostra é defletida, sendo que partículas maiores espalham uma maior intensidade de luz em comparação a partículas menores, e devido a esse espalhamento diferencial da luz é possível determinar a distribuição de tamanho de uma amostra.

As análises de distribuição de tamanho, IP, potencial zeta e pH das MEs foram realizadas em 3 amostras diferentes, conforme é mostrado na tabela 3.

**Tabela 3 – Distribuição de tamanho e índice de polidispersão da formulação de microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) obtida (valores expressos como média  $\pm$  DP)**

<b>Parâmetro</b>	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>
Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	3,16	3,14	3,08	3,13 $\pm$ 0,04
IP	2,33	2,38	2,31	2,34 $\pm$ 0,04
Potencial zeta (mV)	-23,3	-21,3	-23,1	-22,6 $\pm$ 1,10
pH	4,47	4,5	4,49	4,49 $\pm$ 0,02

O tamanho das partículas é um dos fatores determinantes para a biodistribuição e



retenção das partículas no tecido-alvo, e depende, dentre outros fatores, do tipo de equipamento empregado para a obtenção das MEs e da concentração do polímero. O resultado da análise da distribuição do tamanho, que no caso das MEs é realizado por espalhamento de luz estático, deve ser expresso pelo tamanho médio e pela homogeneidade da distribuição do tamanho, a qual refere-se ao IP (CHO; HOLBACK, 2013).

A distribuição do tamanho ideal de um sistema está diretamente relacionada ao propósito da formulação. No caso desse estudo, o objetivo é que as partículas formadas fiquem retidas e aderidas no local de aplicação ao invés de serem facilmente extravasadas, como ocorre com a solução do fármaco atualmente em uso na clínica. Assim, caso as partículas formadas fossem muito pequenas, correria o risco de também permearem pelo tecido e extravasarem e, por isso, descartou-se o uso de um sistema nanoestruturado. Foi então proposto que as partículas tivessem tamanho entre 1 e 20  $\mu\text{m}$ , sendo a faixa ideal para a finalidade proposta do projeto. Os gráficos de distribuição de tamanho mostram que os sistemas obtidos são unimodais, uma vez que seguem uma distribuição Gaussiana.

Valores de índice de polidispersão, também chamados de *span*, em torno de 2 indicam sistemas monodispersos e são apropriados para sistemas de liberação de fármacos (RIBEIRO-COSTA et al., 2009). Valores de IP entre 3 e 5 referem-se a sistemas polidispersos, ou seja, a distribuição do tamanho das partículas é heterogênea. Entretanto, esse pode ser um aspecto positivo da formulação desenvolvida, uma vez que a presença de MEs com tamanhos variados pode levar a perfis de liberação diferentes em um único sistema. Considerando-se que a formulação proposta, ainda que contenha o fármaco atualmente em uso, não cura a doença da papilomatose laríngea recorrente por não ser capaz de erradicar completamente o vírus HPV causador da doença, o uso de uma formulação que apresenta perfis de liberação do fármaco diferentes pode ser mais vantajoso no controle da proliferação do vírus.

O potencial zeta é uma medida indireta da carga presente na superfície de partículas em suspensão, sendo que essa medida é realizada com base na mobilidade eletroforética exercida pelas partículas quando um campo elétrico é aplicado no

meio em que elas se encontram. Esse parâmetro é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O potencial zeta médio da suspensão de MEs foi de  $-22,6 \pm 0,04$  mV, o que está de acordo com outras formulações também à base de PLGA, tanto com relação ao valor em módulo, quanto à carga negativa observada, decorrente do uso do próprio PLGA (LANGE et al., 2017; PAWAR et al., 2010; YUAN et al., 2018). A carga negativa na superfície das MEs, que é decorrente principalmente da presença de grupos ionizáveis com carga parcial negativa no PLGA (-OH), apesar de não oferecer vantagens, não prejudica a interação das micropartículas com a mucosa da prega vocal, que é também carregada negativamente em sua superfície. Valores de potencial zeta como os obtidos nesse estudo são considerados relativamente altos e são importantes para uma boa estabilidade físico-química da suspensão, uma vez que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Contudo, por se tratar de uma suspensão de partículas micrométricas, ainda que o potencial zeta contribua para a não agregação das partículas, o seu tamanho e massa molecular favorecem a sedimentação das MEs, mas, por não formarem uma massa compacta, são facilmente ressuspensas no meio por agitação.

O monitoramento do pH da suspensão de MEs pode indicar informações acerca da estabilidade e da biocompatibilidade da formulação, de modo que valores de pH muito extremos não são viáveis para administração no organismo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

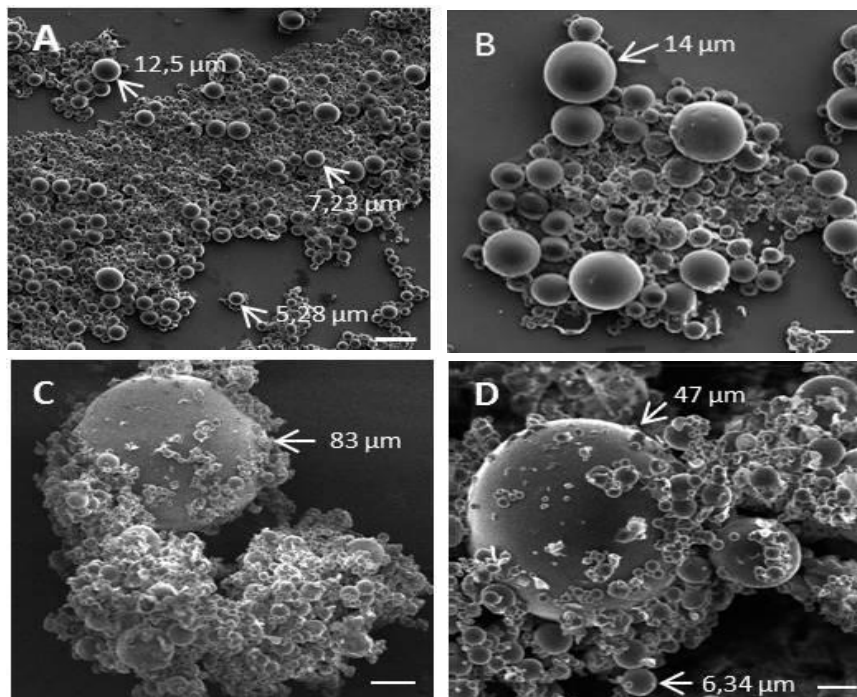
O pH médio encontrado nas diferentes formulações foi de  $4,49 \pm 0,02$ . Esse valor, que se encontra abaixo da neutralidade, pode ser devido à hidrólise sofrida pelo PLGA, que gera monômeros ácidos, capazes de acidificar o meio em que o polímero se encontra. Esse é o processo pelo qual os sistemas de liberação controlada à base de PLGA são degradados para liberarem o fármaco, podendo ser observado em estudos de liberação *in vitro*. Ainda que seja esperado que esse processo ocorra de médio a longo prazo, para justificar o fato de tais formulações serem de liberação

prolongada, nesse caso, a formulação em questão não só apresenta água durante todo o processo de preparo, como também no estado final da formulação, que é uma suspensão aquosa das MEs de PLGA. Esses fatores podem justificar a hidrólise já sofrida pelo PLGA durante o preparo da formulação, ainda que em baixa proporção, mas capaz de acidificar o meio. Já foi demonstrado que a acidez presente em matrizes de micropartículas à base de PLGA, gerada pelos monômeros de degradação liberados pela hidrólise do PLGA pode degradar as cargas macromoleculares que foram encapsuladas, podendo levar à inflamação local quando administrado *in vivo*. Ainda, o controle preciso da sequência de monômeros do PLGA (isto é, o uso de um PLGA precisamente sequenciado) pode ser utilizado para modular não só o comportamento da degradação das micropartículas *in vitro*, como também as propriedades térmicas, perda de massa molecular e a liberação de ácido lático. Apesar do elevado número de artigos publicados sobre o uso do PLGA em sistemas de liberação controlada, poucos produtos à base de PLGA conseguiram aprovação do FDA nas três últimas décadas, sugerindo que esse tipo de intervenção molecular é crucial para otimizar a performance do PLGA em sistemas de liberação de fármacos (WASHINGTON et al., 2017).

### **5.2.3 Estudo da morfologia das MEs por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o objetivo de caracterizar morfologicamente as MEs obtidas, com relação ao tamanho, formato, polidispersividade e aspecto superficial das partículas, bem como avaliar a possível influência do processo de liofilização da formulação na estabilidade e integridade das MEs.

**Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes às microesferas do ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) brancas em suspensão (A e B) e liofilizadas (C e D)**



Escala figuras A e C = 30  $\mu\text{m}$ ; escala figuras B e D = 10  $\mu\text{m}$

Na análise das MEs em suspensão (figura 19 A), é possível perceber que a amostra encontra-se bem concentrada, com a maioria das MEs com tamanho relativamente homogêneo e algumas maiores, com tamanho mais variado, espalhadas pela amostra. Fica claro que se trata de uma amostra polidispersa, isto é, que, apesar de apresentar estruturas com uma média de tamanho homogêneo, contém MEs de tamanhos variados, de 5 a 14  $\mu\text{m}$ . Neste aumento também se nota que as MEs apresentam formato esférico e superfície lisa. A figura 19 B evidencia a morfologia das MEs, que se apresentam esféricas, lisas, homogêneas e sem poros ou deformações na estrutura.

Na análise das MEs liofilizadas, é possível observar que a amostra não suportou bem a voltagem empregada para a amostra em suspensão, como é mostrado na figura 19 C, de modo que as MEs perderam um pouco da sua estrutura esférica e homogênea. Foi perceptível com a análise das imagens subsequentes que a amostra liofilizada mostrou-se menos resistente e mais susceptível a deformações

provocadas pelo feixe de elétrons em comparação à amostra e suspensão. As MEs apresentam-se bastante aglomeradas, o que pode ser decorrente do processo de liofilização. Nessa imagem, a qual foi obtida no mesmo aumento que a figura 19 A, foi detectada uma microesfera medindo aproximadamente 83  $\mu\text{m}$ , o que representa um outlier da amostragem, podendo ser decorrente da aglomeração de diversas MEs, formando uma estrutura só.

O estudo das amostras por MEV permitiu a elucidação das características morfológicas das MEs produzidas. No geral, elas apresentaram-se homogêneas, esféricas, com superfície lisa e tamanhos variados. Devido à fragilidade do material, e considerando-se que não foi empregado nenhum método de fixação e preservação da estrutura, pode-se inferir que as alterações morfológicas apresentadas, principalmente relacionadas à rugosidade das MEs, são decorrentes da incidência do feixe de elétrons, e que se mostraram ainda mais acentuadas com o aumento da voltagem e do aumento. Pela comparação entre as imagens, é possível ainda concluir que o processo de liofilização da formulação, ainda que contribua para uma maior estabilidade, prejudica a morfologia das partículas, o que pode interferir diretamente na liberação do fármaco encapsulado. Portanto, a liofilização das amostras como etapa final da produção das MEs não foi empregada, sendo a formulação armazenada sob a forma de suspensão.

#### **5.2.4 Avaliação do teor de encapsulação do CDV nas MEs**

O teor de encapsulação do CDV foi calculado por meio de uma regra de três entre a quantidade, em  $\mu\text{g}$ , de fármaco adicionado à formulação e que foi injetada no HPLC e a quantidade calculada pela integração do pico de CDV obtido em cromatograma no HPLC. O resultado obtido foi inferior a 5% de encapsulação, de modo que esse resultado não foi dado como satisfatório para considerar uma encapsulação efetiva do CDV nas MEs de PLGA.

Dadas as estruturas químicas tanto do PLGA quanto do CDV, já seria possível prever a dificuldade ou até mesmo a impossibilidade de encapsular o CDV nas MEs pelo método de emulsificação simples O/A seguida pela evaporação do solvente. Já é

bem descrito na literatura que uma das formas de contornar a incompatibilidade química entre fármacos hidrofílicos e polímeros hidrofóbicos é pelo uso do método de emulsificação múltipla do tipo A/O/A (DA SILVA et al., 2012). Contudo, mesmo sendo o método mais utilizado para a encapsulação de fármacos hidrofílicos em micropartículas hidrofóbicas, estudos anteriores demonstraram que a encapsulação do CDV em MEs de PLGA por emulsificação múltipla A/O/A foi muito baixa, de modo que optou-se pelo método de *spray-drying*, pelo qual obteve-se encapsulação de 80% (SANTOYO et al., 2002).

Levando em consideração os dados encontrados na literatura e também as razões apresentadas anteriormente nos métodos, a emulsificação múltipla não foi uma opção a ser considerada durante a elaboração deste trabalho. Assim, algumas alternativas foram propostas e testadas a fim de contornar as incompatibilidades apresentadas. Em um trabalho publicado anteriormente, verificou-se que compostos hidrofílicos e anfifílicos, devido ao baixo valor de log P, têm uma tendência a se distribuírem no excesso de água da fase externa da emulsão, resultando em baixa eficiência de encapsulação. Assim, foram propostas algumas intervenções pelas quais obteve-se êxito, como a adição de um co-solvente na fase orgânica da formulação para aumentar a solubilidade do fármaco hidrofílico, aumento da concentração de PLGA na fase orgânica e o ajuste do pH da fase externa (RAMAZANI et al., 2016). Em um outro estudo, obteve-se sucesso com o uso de um co-solvente para aumentar a solubilidade do fármaco hidrofílico na fase orgânica da formulação. Além disso, aumentou-se a eficiência de encapsulação pela adição de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), de modo que o  $\text{Ca}^{2+}$  atuou como contra-íon para o fármaco utilizado, alendronato, diminuindo a sua solubilidade em água (COHEN-SELA et al., 2009). Testou-se, ainda, a adição de estearilamina na formulação, baseando-se nesse mesmo princípio de formação de um par iônico entre a amina lipofílica e o CDV, de modo que a grande cadeia carbônica da estearilamina contribuiria para a diminuição da hidrossolubilidade do CDV.

Apesar de todos os métodos testados, nenhum mostrou-se capaz de melhorar a encapsulação do CDV nas MEs de PLGA, o que pode ser explicado pela sua elevada hidrossolubilidade (170 mg/mL). Entretanto, devido a dificuldades para aquisição do CDV, optou-se por desenvolver a formulação e realizar algumas

análises de caracterização das partículas brancas (sem o fármaco) a fim de elucidar as características do sistema proposto. Só com a chegada do fármaco, vários meses após o início do estudo, é que foi possível confirmar a impossibilidade de encapsular o CDV nesse sistema e, por isso, os resultados de caracterização obtidos para as MEs de PLGA referem-se apenas às partículas brancas. Contudo, apesar de a formulação desenvolvida não ser capaz de veicular o fármaco em questão, ela apresentou características morfológicas satisfatórias para possível encapsulação de outros fármacos. Além disso, como será mostrado nas análises posteriores, as MEs de PLGA mostraram-se biocompatíveis para administração *in vivo*.

### **5.3 CONCLUSÃO**

As MEs de PLGA 75:25 foram obtidas pelo método de emulsificação simples O/A seguida pela evaporação do solvente, o qual mostrou-se reprodutível e eficaz. As partículas obtidas foram caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta, MEV e teor de encapsulação e mostraram-se com tamanho inferior a 10 µm, polidispersas, potencial zeta alto e negativo, indicando estabilidade da suspensão e morfologia esférica, com superfície íntegra e lisa. O teor de encapsulação do CDV pelas MEs foi considerado insuficiente para a continuidade dos estudos propostos. Isso se deve à incompatibilidade de associar, em uma mesma formulação, um polímero hidrofóbico com um fármaco atamente hidrofílico, utilizando o método proposto. A formulação desenvolvida, contudo, mostrou-se adequada para encapsulação de outros fármacos com caráter hidrofóbico.

## **MICROESFERAS DE HPMC E CARBOPOL**

### **5.4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.4.1 Materiais**

Cidofovir hidratado (massa molecular = 297,2 g/mol) – Sigma-Aldrich Ltda; São Paulo, Brasil; Citidina monofosfato; HPMC K100 Methocel® LV Premium USP - Colorcon; carbopol 940; acetonitrila grau CLAE - Merck Brasil; Rio de Janeiro, Brasil;

metanol PA - Proquímios; éter de petróleo - Quimex; trietanolamina; ácido fosfórico – Synth; Polissorbato 80 - Neon; Spam<sup>®</sup> 80 - Sigma-Aldrich Ltda; óleo mineral branco 70 USP; fosfato de tetrabutylamônio – JT Baker; fosfato de sódio monobásico monohidratado - Sigma-Aldrich Ltda; água ultrafiltrada – Milli Q plus, Millipore, EUA; Billerica, Estados Unidos; água destilada; Ultraturax<sup>®</sup>; pHmetro; rotaevaporador; cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent; mastersizer 3000 laser diffraction particle size analyzer Beckman Coulter<sup>®</sup>.

#### 5.4.2 **Métodos**

##### 5.4.2.1 **Desenvolvimento das microesferas biodegradáveis à base de HPMC K100 e Carbopol 940 brancas e contendo CDV**

O desenvolvimento das partículas a partir de uma blenda, isto é, associação de dois ou mais polímeros, contendo HPMC K100 e carbopol 940 foi baseado no processo de reticulação iônica polimérica, o qual envolve a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas por meio do ajuste de pH da formulação. Considerando-se que um dos polímeros da blenda, a HPMC, é hidrossolúvel e que o estágio final da formulação envolve a ressuspensão das partículas em água, o objetivo da realização dessa etapa foi aumentar a resistência física das MEs e diminuir a sua molhabilidade pela água, bem como favorecer o aprisionamento do fármaco nas partículas, aumentando o teor de encapsulação.

Assim como as MEs de PLGA, as MEs de HPMC e carbopol foram desenvolvidas pelo processo de formação de emulsão simples, mas nesse caso foi uma emulsão do tipo água em óleo (A/O) seguido pela evaporação do solvente. Para tanto, duas fases foram preparadas, sendo uma oleosa, composta por óleo mineral e Span<sup>®</sup> 80 (surfactante hidrofóbico), e uma aquosa, composta por água destilada, HPMC K100, Carbopol 940 e Tween<sup>®</sup> 80 (surfactante hidrofílico), no caso da formulação branca. Para a incorporação do fármaco, o CDV foi acrescentado na fase aquosa devido à sua elevada hidrossolubilidade. São apresentadas no quadro 6 as proporções utilizadas de cada reagente para o preparo das formulações. Após o preparo das duas fases e completa solubilização dos componentes, a fase oleosa foi colocada

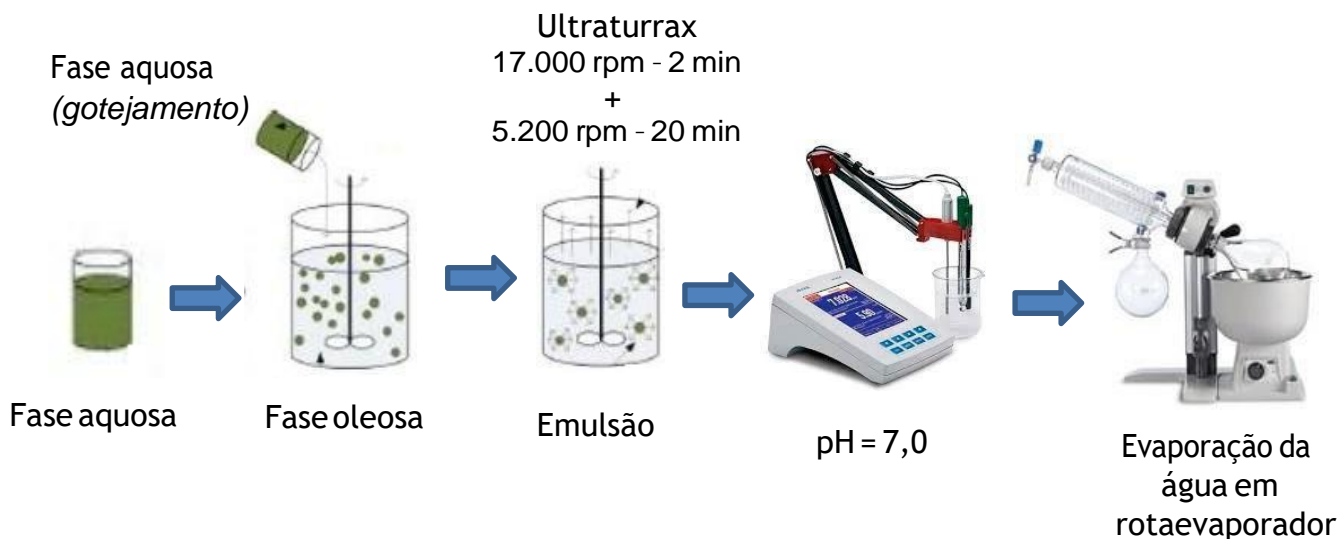


sob agitação pelo Ultraturrax<sup>®</sup>, enquanto a fase aquosa era gotejada sobre a oleosa para formação da emulsão. Uma vez pronta a emulsão, ajustou-se o pH da formulação para 7,0 com solução concentrada de trietanolamina, que foi em seguida colocada em um rotaevaporador para completa remoção da água. A formulação foi, então, deixada em repouso para sedimentação das partículas. O óleo mineral foi retirado com o auxílio de uma pipeta volumétrica, sendo que o restante de óleo foi lavado com éter de petróleo. Após esse processo, as MEs foram armazenadas em dessecador ou então ressuspensas em água destilada para posterior realização das análises de caracterização e quantificação. As condições de preparo e as etapas do processo de obtenção das microesferas são demonstradas pelo fluxograma na figura 20.

**Quadro 6 - Composição, em porcentagem, de todos os componentes da formulação de microesferas da blenda de hidroxipropilmetilelulose (HPMC) e carbopol**

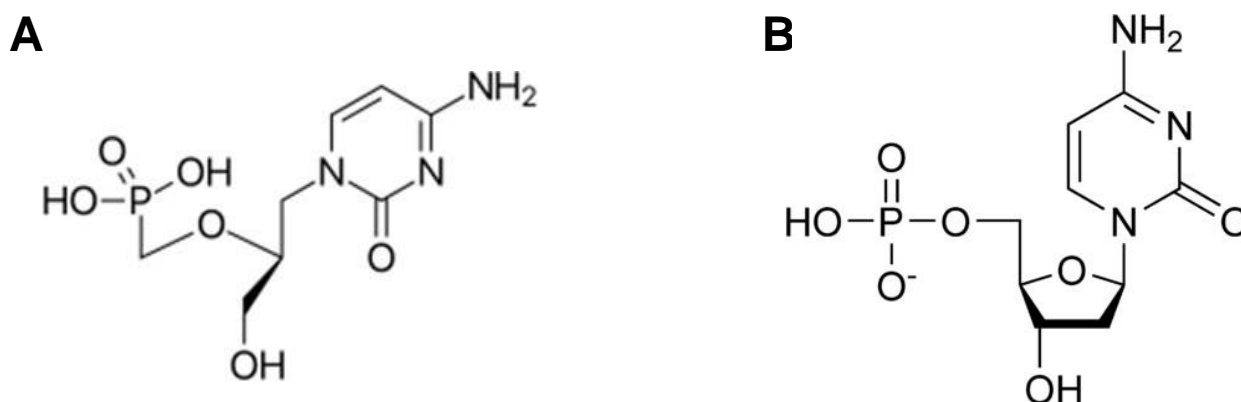
<b>Constituintes</b>	<b>Fase orgânica</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Fase aquosa</b>	<b>Concentração (%)</b>
<b>Solvente</b>	Óleo mineral		Água destilada	-
<b>Polímero</b>	-	-	HPMC K100 Carbopol 940	0,2
<b>Surfactante hidrofílico</b>	-	-	Tween <sup>®</sup> 80	1,0
<b>Surfactante hidrofóbico</b>	Spam <sup>®</sup> 80	4,5	-	-
<b>Conservante</b>	-	-	Tiosulfato de sódio	0,2

**Figura 20 – Fluxograma contendo as condições ideais para obtenção das microesferas da blenda hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) + carbopol**



A produção de MEs de PLGA foi a proposta inicial do projeto devido ao respaldo que o uso do PLGA já apresenta. Contudo, como não foi possível encapsular o CDV na formulação desenvolvida, buscou-se uma alternativa para carreamento desse fármaco em MEs à base de polímeros com caráter mais hidrofílico, como é o caso do HPMC e do carbopol. Durante as tentativas de encapsulação do CDV nas MEs de PLGA, além dos outros experimentos que estavam sendo desenvolvidos em paralelo, muito fármaco foi gasto, limitando a quantidade do mesmo para o desenvolvimento de novas formulações. Após o desenvolvimento das partículas da blenda de HPMC e carbopol, verificou-se que houve encapsulação do CDV, no entanto, como a quantidade disponível do fármaco era muito pequena, os resultados preliminares obtidos não eram seguros e poderiam ser otimizados. Assim, buscando uma alternativa para contornar esse problema, utilizou-se a CTD, um nucleosídeo cuja estrutura química é bastante semelhante ao CDV, para verificar, por simulação, o teor de encapsulação do fármaco na formulação, bem como realizar as outras análises de caracterização. As estruturas do CDV e da citidina são apresentadas na figura 21, a fim de comparação. Ainda que não seja possível garantir que os resultados apresentados para a citidina sejam completamente reproduzíveis com o CDV, dada a semelhança química entre os fármacos, pode-se assumir que eles sejam pelo menos próximos.

Figura 21 – Estrutura química do cidofovit (A) e da citidina monofosfato (B)



#### 5.4.2.2 Distribuição do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das microesferas

Para determinar o tamanho e o índice de polidispersão das MEs, foi utilizado o equipamento Mastersizer<sup>®</sup> 3000, Beckman Coulter, e as MEs brancas foram ressuspensas em água destilada antes de serem analisadas no equipamento. A distribuição de tamanho é apresentada por gráfico e tabela contendo tamanhos correspondentes à média e mediana. O índice de polidispersão é calculado segundo a fórmula já apresentada anteriormente.

Para a determinação do potencial zeta foi utilizado o equipamento Zetasizer<sup>®</sup> Nano ZS90, Malvern, cerca de 1 mL da amostra de MEs brancas foi colocado em uma célula capilar descartável à base de policarbonato, contendo eletrodos. O potencial zeta das MEs foi determinado logo após ressuspensão das partículas, a 25°C.

#### 5.4.2.3 Estudo da morfologia das MEs por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises de MEV foram utilizadas as MEs da blenda brancas e as MEs contendo a CTD, em suspensão. O processo de liofilização não foi empregado devido ao resultado obtido para as MEs de PLGA, nas quais a liofilização provocou a deformidade das partículas. Dessa forma, foi adicionada uma gota da suspensão de

cada amostra sobre uma lamínula de vidro posicionada em cima do stub metalizado. Após a secagem natural das amostras, foi realizado o processo de metalização com carbono, ficando as amostras, em seguida, armazenadas até o momento da análise no MEV. O preparo das amostras e a aquisição das imagens foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG e as condições de análise como voltagem e aumentos estão relacionadas na quadro 7.

**Quadro 7 – Condições ótimas de análise das microesferas da blenda de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carbopol por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condição ótima de análise</b>
Modelo do microscópio	JEOL JSM 6360LV
Voltagem	10 kV
Aumentos	100, 1000 e 5000 x

Aliado à análise microscópica por varredura, foi utilizado o EDS, sigla em inglês para espectrometria de energia dispersiva de raios X, que é uma técnica na qual os raios X gerados a partir da interação entre feixe de elétrons e amostra são analisados para determinar a composição elementar da amostra, de modo que os elementos individuais possam ser identificados nos espectros. A análise por EDS teve como principal objetivo identificar a presença da CTD no interior das MEs, sendo mais um indício da encapsulação do fármaco.

#### **5.4.2.4 Avaliação do teor de encapsulação da CTD nas MEs**

O teor de encapsulação da CTD foi avaliado por CLAE, utilizando o método analítico validado para a quantificação do CDV. Ainda que não seja adequada a utilização de um método desenvolvido e validado especificamente para um fármaco para a quantificação de outro fármaco, como explicado anteriormente, a introdução da CTD nos experimentos desse estudo ocorreu quando já não havia tempo hábil para o desenvolvimento de um método específico para a sua quantificação por CLAE. Não obstante, dada a semelhança química entre o CDV e a CTD, optou-se por dosar a CTD encapsulada nas MEs da blenda a fim de comprovar a eficiência da formulação desenvolvida, ainda que os resultados possam não ser totalmente fidedignos.

Para o preparo da amostra, uma alíquota da suspensão de MEs recém preparada foi adicionada à uma solução de ácido fosfórico e água (2:1) para completa solubilização e abertura das partículas. Em seguida, foi realizada uma diluição da amostra em acetonitrila, de modo que a concentração teórica de CTD estivesse dentro da curva de calibração obtida na validação do método. A solução final foi então filtrada em filtro Millex<sup>®</sup> 0,45 µm e transferida para vial para posterior injeção no equipamento.

## **ANÁLISE TÉRMICA**

### **5.4.2.5 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

O comportamento térmico das partículas da blenda foi avaliado utilizando-se o calorímetro modelo DSC50 (Schimadzu), de acordo com a norma ASTM D3418, que regulariza os procedimentos de análise por DSC. Foram pesados cerca de 2-3 mg das amostras de CDV, CTD, HPMC K100, carbopol 940, a mistura física dos dois polímeros, as microesferas brancas, bem como as MEs contendo o fármaco. Após pesadas, as amostras foram acondicionadas e seladas em cadinhos de alumínio semi-herméticos e submetidas a um aquecimento de 10°C/min, de 25 a 250°C, sob atmosfera inerte de gás nitrogênio.

## **5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.5.1 Desenvolvimento das microesferas biodegradáveis à base de HPMC K100 e Carbopol 940 brancas e contendo CD**

O HPMC K100 é um polímero hidrofílico que promove liberação retardada do fármaco nele encapsulado, sendo amplamente utilizado para terapias a longo prazo com alta margem de segurança (AREFIN; HASAN; REZA, 2016). Além disso, a estrutura bem definida, a grande variedade de subtipos e a consistência que pode ser adquirida nas amostras, a estabilidade em uma ampla faixa de pH (3,0 a 11,0) e uma considerável resistência enzimática são fatores que tornam o HPMC o polímero de escolha para os sistemas de liberação controlada à base de matrizes hidrofílicas (KULINOWSKI et al., 2012). Uma das principais razões para o uso do HPMC, além daquelas já mencionadas, está relacionada à sua capacidade de adquirir um aspecto gelatinoso não só quando entra em contato com a água, mas também por

intervenções físico-químicas, como o ajuste da temperatura e da força iônica do meio (pH) (RAY et al., 2009; SILVA et al., 2008).

Os carbopois são polímeros sintéticos do ácido acrílico e de caráter aniônico, sendo considerados materiais não irritantes e não tóxicos. Essa classe de polímeros absorve água rapidamente, hidrata-se e incha-se, e portanto, é considerada uma classe essencialmente hidrofílica (CHAWLA; SARAF, 2012). Além disso, as ligações cruzadas existentes no carbopol, propriedade também conhecida como *crosslinking* ou reticulação, fazem dele um grande candidato para o uso em formulações do tipo gel e particuladas (DAS; NAYAK; NANDA, 2013). O caráter aniônico do carbopol deriva da presença de grupos carboxilas presentes na sua estrutura que, quando neutralizados pela adição de uma base (mais comumente trietanolamina ou hidróxido de sódio) provocam o estiramento das cadeias poliméricas, aumentando a sua capacidade espessante e, conseqüentemente, a reticulação do polímero como um todo.

Devido às características referentes ao HPMC e ao carbopol que foram expostas, buscou-se desenvolver uma nova partícula a fim de contornar os problemas relatados com as MEs de PLGA para veicular o CDV. Ao invés de serem desenvolvidas diferentes MEs, cada uma com um polímero, optou-se pela produção de MEs compostas por uma blenda polimérica, contendo o HPMC e o carbopol. Tal abordagem teve por objetivo potencializar as propriedades físico-químicas da partícula e, principalmente, aumentar a eficiência de encapsulação do CDV, o que foi justificado pelo poder de gelificação e reticulação dos polímeros. A associação de polímeros para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos já é bem descrita na literatura (HAGHSHENAS et al., 2015; TERENCE et al., 2011), de modo que Changez e colaboradores (2003) demonstraram que um único polímero em uso não consegue regular a taxa de liberação do fármaco em um sistema de liberação controlada com performance adequada e, portanto, a combinação de dois ou mais polímeros pode ser uma abordagem mais eficaz (CHANGEZ et al., 2003).

As principais abordagens para promover a reticulação dos polímeros descritos envolvem variações térmicas, no caso do HPMC, e ajuste de pH, no caso do carbopol. Apesar de terem sido realizados alguns testes envolvendo ciclos de

congelamento e descongelamento e aumento gradativo da temperatura para aumento da viscosidade do HPMC, optou-se por não utilizar processamento térmico no preparo da formulação, pelo risco de alteração das propriedades do fármaco e pela dificuldade em ajustar a condição térmica para obtenção da viscosidade ideal do HPMC. Assim, baseado na literatura (BASHIR et al., 2013; RAY et al., 2009) e em evidências experimentais, decidiu-se realizar a reticulação das MEs pelo ajuste de pH da formulação, tendo interferência direta na formação de ligações cruzadas nas moléculas do carbopol. O ajuste do pH, bem como a incorporação de agentes modificadores do pH, nos sistemas matriciais de liberação controlada tem sido uma estratégia usual para obter o perfil de liberação desejado (RAUT et al., 2013). A escolha dessa abordagem, contudo, antes mesmo de visar modular a liberação do fármaco, teve por objetivo melhorar a encapsulação do CDV, e obteve-se resultado satisfatório, como será exposto adiante.

Como exposto anteriormente, devido à baixa disponibilidade do CDV, os testes para desenvolvimento dessa formulação foram realizados com a citidina (CTD). Para verificar se o ajuste do pH com a trietanolamina em diferentes fases do preparo da formulação poderia interferir no resultado final, primeiramente ajustou-se o pH da fase aquosa, contendo HPMC, carbopol, CTD e a água, para 7,0, antes do processo de emulsificação pelo Ultraturax<sup>®</sup>; em um outro experimento, o pH foi ajustado, também para 7,0, após a formação da emulsão, antes desta ser levada ao rotavapor para evaporação da água. Pela quantificação da CTN por CLAE, observou-se que o ajuste do pH após a formação das MEs, isto é, após o processo de emulsificação pelo Ultraturax<sup>®</sup>, levou a um maior teor de encapsulação do fármaco em comparação à outra formulação, e, por isso, decidiu-se manter essa formulação. O método para a obtenção das MEs mostrou-se, portanto, eficaz, simples e reprodutível.

Devido ao uso do éter de petróleo para lavagem das MEs e remoção do excesso de óleo mineral presente na formulação, nesta etapa do trabalho também seria ideal que fosse desenvolvido um método para detecção de solvente residual, devido à elevada toxicidade desse solvente. Entretanto, não houve disponibilidade para a realização desta etapa do projeto, ficando como perspectiva para complementações futuras.

### 5.5.2 Distribuição do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das microesferas

As análises de distribuição de tamanho, IP e potencial zeta das MEs foram realizadas nas MEs brancas e nas MEs contendo a CTD, sendo 3 amostras de cada tipo, conforme é mostrado nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

**Tabela 4 – Distribuição de tamanho e índice de polidispersão da formulação obtida de microesferas da blenda de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carbopol brancas (valores expressos como média  $\pm$  DP)**

Parâmetro	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média $\pm$ DP
Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	37,99	35,24	37,09	36,77 $\pm$ 1,40
IP	1,97	2,01	1,97	1,98 $\pm$ 0,02
Potencial zeta (mV)	-22,8	-21,9	-22,23	-22,31 $\pm$ 0,46

**Tabela 5 – Distribuição de tamanho e índice de polidispersão da formulação obtida de microesferas da blenda de hidroxipropilmetilelulose (HPMC) e carbopol contendo citidina (valores expressos como média  $\pm$  DP)**

Parâmetro	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média $\pm$ DP
Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	55,60	57,88	57,37	56,95 $\pm$ 1,20
IP	2,16	2,08	1,99	2,07 $\pm$ 0,09
Potencial zeta (mV)	-53,9	-53,4	-52,7	-53,3 $\pm$ 0,60

Nota-se pelos valores apresentados nas Tabelas 4 e 5 que, ainda que as duas partículas tenham sido obtidas pelo mesmo tipo de processo, sob as mesmas condições de agitação pelo Ultraturrax<sup>®</sup>, as MEs da blenda apresentaram tamanho consideravelmente superior às MEs de PLGA, as quais tiveram tamanho médio de 3,13  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Esse resultado pode ser explicado pelas próprias características físico-químicas do HPMC e do carbopol que, somadas ao processo de reticulação que foi empregado, aumentaram a viscosidade do sistema e, por isso, mesmo a frequência de agitação bastante elevada do Ultraturrax<sup>®</sup> não foi suficiente



para reduzir ainda mais o tamanho das partículas. Observa-se, ainda, que a encapsulação da CTD levou a um aumento ainda maior no diâmetro das MEs.

O resultado obtido está de acordo com dados relatados por alguns autores (AREFIN; HASAN; REZA, 2016; BASHIR et al., 2013; RAUT et al., 2013), sugerindo que a distribuição do tamanho de MEs à base de HPMC e carbopol está mais relacionada à natureza dos polímeros do que ao processo de obtenção das partículas em si. No entanto, o tamanho médio obtido no processo desenvolvido é menor em comparação ao encontrado na literatura no que se refere a MEs à base de HPMC e carbopol. Isso pode ser explicado pela baixa concentração de polímeros que foi utilizada, uma vez que, como demonstrado por Sharma e colaboradores, o aumento na concentração desses polímeros leva a um aumento na viscosidade da formulação e que, por consequência, gera partículas maiores. Nesse mesmo trabalho foi elucidada, ainda, a influência da frequência de agitação durante o processo de emulsificação, a qual é inversamente proporcional ao tamanho das partículas; enquanto Sharma e colaboradores avaliaram a agitação dentro de uma faixa entre 600 e 900 rpm, neste projeto utilizou-se uma agitação de 17000 rpm por 2 min, seguida de 5200 rpm por 20 min (SHARMA; KOHLI; DINDA, 2015). Assim, todos esses fatores combinados justificam a distribuição de tamanho obtida nessa formulação.

O potencial zeta das MEs da blenda branca mostrou-se semelhante ao encontrado para as partículas de PLGA. Além disso, o elevado valor em módulo dos resultados obtidos para as três amostras é indicativo de estabilidade da formulação, tornando-se ainda mais relevante pelo fato de tratar-se de uma suspensão. Ainda que o potencial zeta apresentado contribua para uma ressuspensão adequada das partículas, devido ao tamanho consideravelmente maior das MEs, o sedimento formado quando a formulação permanece em repouso por um período prolongado torna-se bastante denso, de tal forma que a ressuspensão ocorre com certa dificuldade. Assim, o ideal é que a formulação seja preparada para uso extemporâneo, ou que sejam adicionados agentes suspensores no meio.

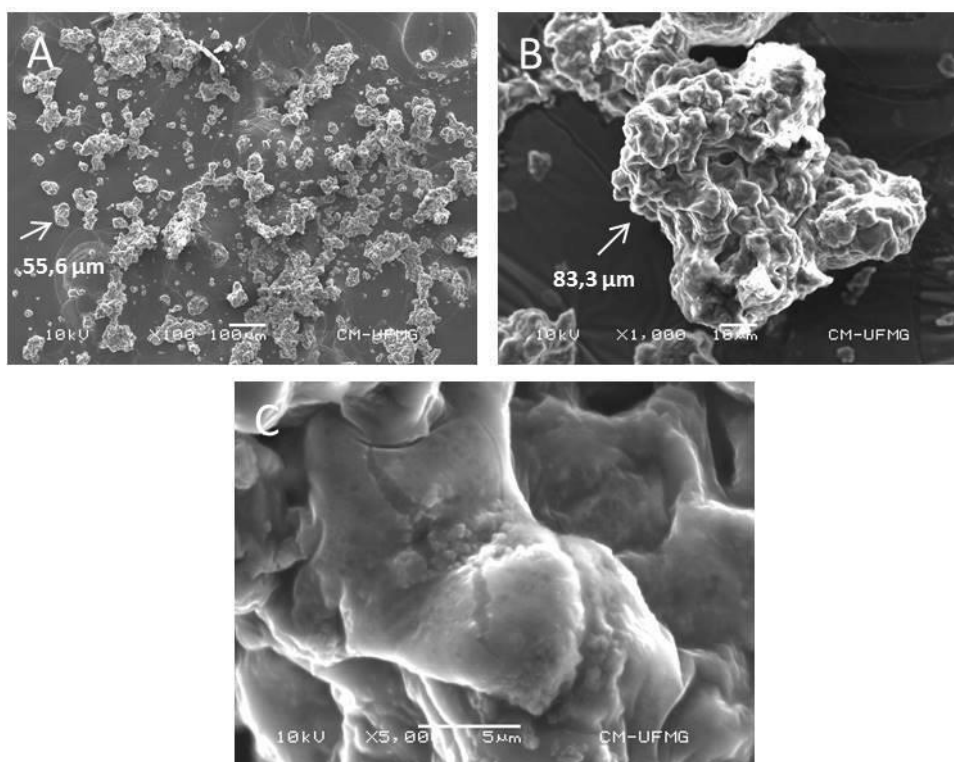
É interessante observar que, não só o tamanho das MEs contendo o fármaco aumentou, como também houve um aumento considerável, em módulo, no potencial

zeta, passando de uma média de -22,31 para -53,30 mV. A CTD, assim como o CDV, possui em sua estrutura um grupo fosfonato e hidroxilas capazes de se ionizarem, conferindo uma carga formal negativa ao fármaco, o que explica o aumento no potencial zeta das MEs contendo o fármaco. Esse fato, além de ser um indício da encapsulação da CTD nas partículas, pode ser extrapolado ao CDV, dada a semelhança química entre ambos.

## 1.2 Estudo da morfologia das MEs por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de verificar a morfologia das MEs à base de HPMC e carbopol, foi realizada a análise por MEV, a partir da qual foi possível avaliar o formato, o tamanho e a integridade superficial das partículas. As figuras 22 e 23 contêm as imagens referentes às MEs brancas e às MEs contendo a CTD, respectivamente.

**Figura 22 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes às microesferas da blenda de hidroxipropilmetilelulose (HPMC) e carbopol brancas em diferentes aumentos**



A primeira característica a ser observada pela análise da figura 22 é que, ao

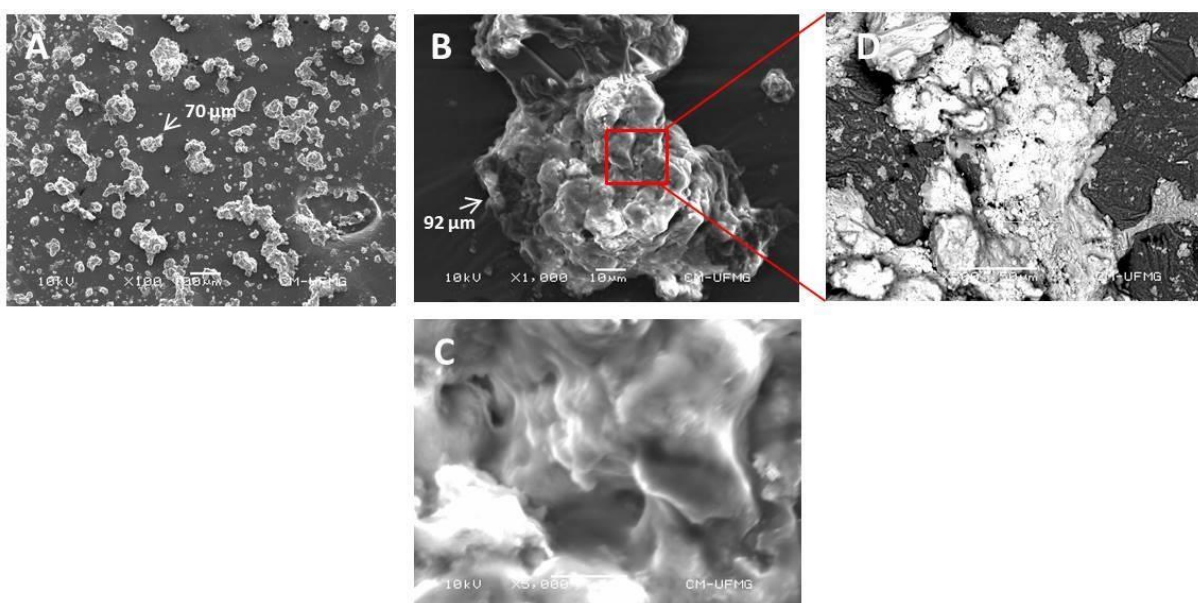
contrário das partículas de PLGA, as partículas da blenda não têm o formato esférico esperado. Nota-se pela figura 22 A que essa formulação também é polidispersa, pois apresenta uma população de partículas com tamanhos variados. Entretanto, como já relatado, a ressuspensão dessa formulação ocorre com uma certa dificuldade e, portanto, as partículas observadas na imagem 22 A podem se referir tanto a partículas individuais, quanto a alguns aglomerados decorrentes da ressuspensão ineficiente da formulação, principalmente devido ao fato de que as amostras não foram preparadas no mesmo dia da análise, o que potencializou o efeito da sedimentação.

As figuras 22 B e C, que mostram uma partícula isolada, evidenciam a característica amorfa da partícula, além da superfície rugosa e com cavidades. As características apresentadas são bastante relatadas na literatura em formulações que utilizam a HPMC pura ou em combinação com outros polímeros para o preparo de sistemas de liberação particulados. Foi relatado em estudos anteriores que as partículas desenvolvidas utilizando-se apenas o carbopol 940, o mesmo utilizado na formulação deste projeto, apresentaram formato esférico e com superfície lisa. Em contrapartida, as MEs preparadas com a HPMC mostraram-se com superfície regular, mas sem formato definido (BASHIR et al., 2013). Em um outro estudo, as características morfológica das partículas foram atribuídas à concentração do HPMC na formulação, de modo que as MEs com maior proporção de polímero apresentaram superfície mais lisa e homogênea devido a uma reticulação por *cross-linking* potencializada pela presença de maior quantidade de polímero. Além disso, demonstrou-se que a superfície rugosa das MEs de HPMC aumenta o contato com a água em relação às MEs lisas, o que pode justificar a fusão entre as partículas, uma vez que a hidratação da HPMC a torna gelatinosa, favorecendo a aglutinação (AREFIN; HASAN; REZA, 2016).

Outro aspecto a ser observado é com relação ao tamanho das partículas medido por espalhamento de luz estático e ao tamanho medido por MEV. Enquanto que para as MEs de PLGA houve menor discrepância entre as duas medições, as MEs da blenda apresentaram tamanho consideravelmente maior quando analisadas por MEV, saindo de uma média de 36,77  $\mu\text{m}$  para partículas com diâmetro de até 83,3  $\mu\text{m}$ , no caso das MEs brancas, e 92  $\mu\text{m}$  para as MEs contendo CTD. Esse fato pode

ser explicado pela evaporação da água da formulação durante o preparo da amostra, que levou à maior concentração das MEs na formulação, e, somado à propriedade mucoadesiva da HPMC, favoreceu a aglutinação das partículas, resultando em MEs com maior diâmetro.

**Figura 23 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes às MEs da blenda polimérica contendo citidina em diferentes aumentos (A, B e C) e imagem obtida por espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) (D)**

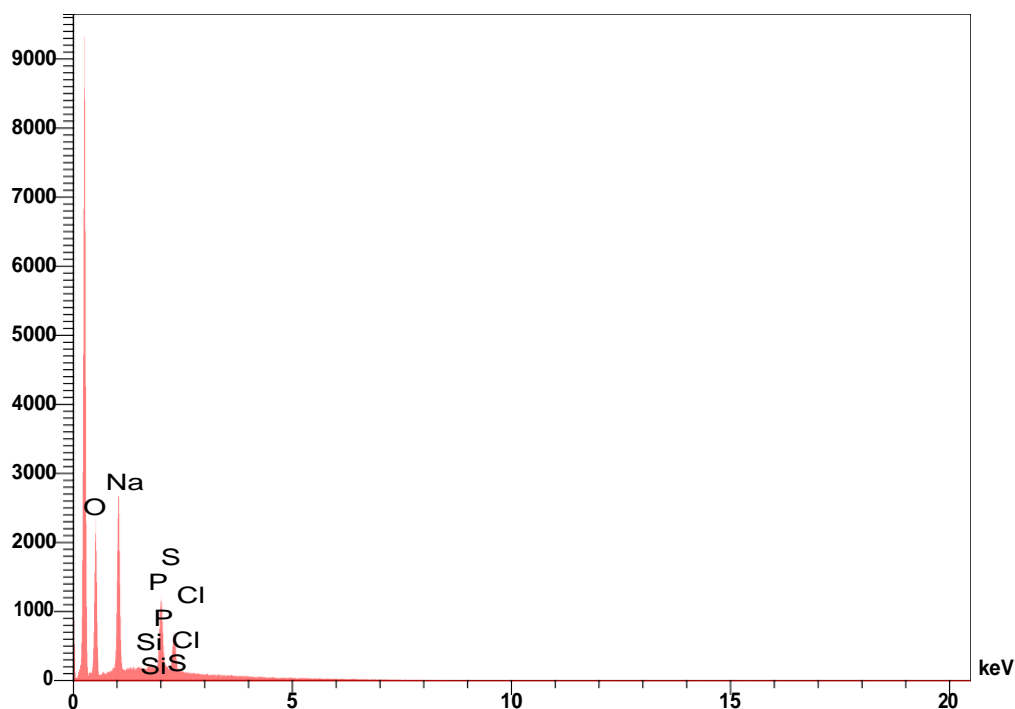


Considerando-se o aspecto superficial, as partículas contendo a CTD apresentaram-se também amorfas, irregulares e rugosas. Houve um aumento no tamanho em relação às partículas brancas, assim como observado pela análise de espalhamento de luz, sendo um resultado indicativo da encapsulação do fármaco.

Com o objetivo de confirmar o encapsulamento da CTD pelas MEs, foi acoplado ao MEV o sistema de espectrometria de energia dispersiva de raios X, técnica conhecida como EDS, através da qual é possível determinar a composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras a partir da emissão de raios X característicos, os quais são provenientes da camada eletrônica Ka. No espectro dispersivo da energia resultante dos raios X, as radiografias emitidas correspondem a picos visíveis, cuja identificação fornece informações acerca dos elementos que estão presentes na amostra. O gráfico do espectro correspondente à análise das

MEs contendo a CTD está disposta na figura 24. Uma das limitações da análise por EDS é o fato de apenas elementos com número atômico maior que 4 poderem ser detectados e quantificados. Contudo, esse não foi um problema para o estudo em questão, uma vez que buscou-se encontrar o elemento fósforo (P), cujo número atômico é 15, e que está presente na molécula da CTD. Os dados quantitativos sobre a composição da amostra são derivados das diferentes intensidades dos picos presentes no espectro. (DUARTE et al., 2003)(RESOLUTIONS, 2006).

**Figura 24 – Espectro dos raios X característicos correspondente à análise das microesferas contendo citidina pela técnica de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS)**



**Tabela 6 – Relação dos elementos químicos identificados nas microesferas contendo citidina pela técnica de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS)**

Elt	XRay	Int	Error	K	Kratio	W%	A%	ZAF	Ox%	Cat#
C	Ka	835.0	3.4539	0.8170	0.3762	69.03	76.27	0.7761	0.00	0.00
O	Ka	221.8	1.7802	0.0939	0.0432	24.65	20.45	3.4421	0.00	0.00
Na	Ka	282.6	2.0092	0.0417	0.0192	3.89	2.25	1.5785	0.00	0.00
Si	Ka	32.4	0.6806	0.0041	0.0019	0.23	0.11	1.0185	0.00	0.00
P	Ka	171.7	1.5663	0.0239	0.0110	1.25	0.54	1.0074	0.00	0.00
S	Ka	105.1	1.2254	0.0161	0.0074	0.79	0.33	0.9587	0.00	0.00
Cl	Ka	20.2	0.5369	0.0033	0.0015	0.17	0.06	0.9977	0.00	0.00
				1.0000	0.4604	100.00	100.00		0.00	0.00

Os elementos sódio (Na), silício (Si), carbono (C) e oxigênio (O) identificados são constituintes da lamínula de vidro na qual foi depositada a amostra. Carbono e oxigênio também são provenientes da amostra, o que justifica a maior concentração desses elementos. Não se sabe ao certo a procedência do cloro (Cl) e enxofre (S) encontrados, podendo ser decorrentes do éter de petróleo utilizado no preparo da amostra, o qual é bastante impuro. A presença do elemento fósforo é decorrente da CTD, uma vez que é o único composto, dentre todos os outros presentes na amostra, que possui esse elemento (presente no grupo fosfonato) e, portanto, confirma-se a hipótese de encapsulação da CTD pelas MEs da blenda.

### **5.5.3 Avaliação do teor de encapsulação da CTD nas MEs**

O teor de encapsulação da CTD foi calculado por meio de uma regra de três entre a quantidade, em µg, de fármaco adicionado à formulação e que foi injetada no HPLC e a quantidade calculada pela integração do pico de CTD obtido em cromatograma no HPLC. O resultado médio obtido foi de  $50,2 \pm 0,7\%$  de encapsulação da CTD nas MEs da blenda, enquanto que para as MEs de PLGA não foi encontrado nenhum valor acima de 5%. O primeiro teste de encapsulação foi realizado com o CDV, no qual obteve-se aproximadamente 27% de encapsulação. No entanto, considerando-se que a massa de partida do CDV já estava muito baixa, devido à pouca disponibilidade do fármaco, e que durante algumas etapas do processo de produção

das partículas poderia ainda ter ocorrido alguma perda do fármaco, julgou-se que talvez o resultado obtido não estivesse refletindo o real potencial de encapsulação pela formulação. Por essa razão, decidiu-se substituir o CDV pela CTD para que fosse possível utilizar quantidades razoáveis de fármaco e polímero e verificar o real teor de CTD encapsulada nas MEs da blenda.

O considerável aumento na encapsulação do fármaco deveu-se a uma combinação de fatores, que envolvem a escolha de uma matriz polimérica compatível com o fármaco proposto; o processo de reticulação iônica empregado, que aumentou as ligações cruzadas entre as cadeias do carbopol, favorecendo uma maior rigidez das MEs e consequente capacidade de retenção do fármaco; e o aumento nas quantidades utilizadas para o preparo da formulação, tanto dos polímeros quanto do fármaco, mantendo-se as concentrações propostas.

A dificuldade da veiculação de fármacos hidrofílicos em sistemas de liberação já é bem elucidada, e ela ocorre devido principalmente ao fato de que grande parte dos processos de obtenção de partículas envolve a presença de água em pelo menos uma etapa do processo, principalmente nos processos de emulsificação. Assim, para evitar que o fármaco hidrofílico permaneça todo na água, é essencial que o fármaco tenha afinidade suficiente pela matriz polimérica utilizada, sendo que esse fator depende da compatibilidade química entre ambos. A escolha da HPMC e do carbopol, ambos hidrossolúveis, possibilitou uma maior interação entre o CDV e a CTD com a matriz polimérica, de modo que foi possível aprisioná-los nas partículas formadas. Srivastava e colaboradores (2005) obtiveram aproximadamente o mesmo teor de encapsulação do fármaco nas MEs de HPMC desenvolvidas, em uma média de 55,0% (SRIVASTAVA; RIDHURKAR; WADHWA, 2005). Zhou e colaboradores (2012) também descreveram 42,33% de encapsulação de furazolidona em MEs mucoadesivas à base de HPMC e carbopol.

O teor de encapsulação da CTD pelas MEs da blenda polimérica mostrou-se satisfatório e em concordância com dados relatados na literatura. Estudos posteriores para padronização da formulação fazem-se necessários para otimizar o processo de encapsulação de fármacos e garantir a sua reprodutibilidade.

## **ANÁLISE TÉRMICA**

Análise térmica é um termo que abrange um conjunto de técnicas pelas quais uma propriedade física de uma substância e ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO; GIOLITO, 1980).

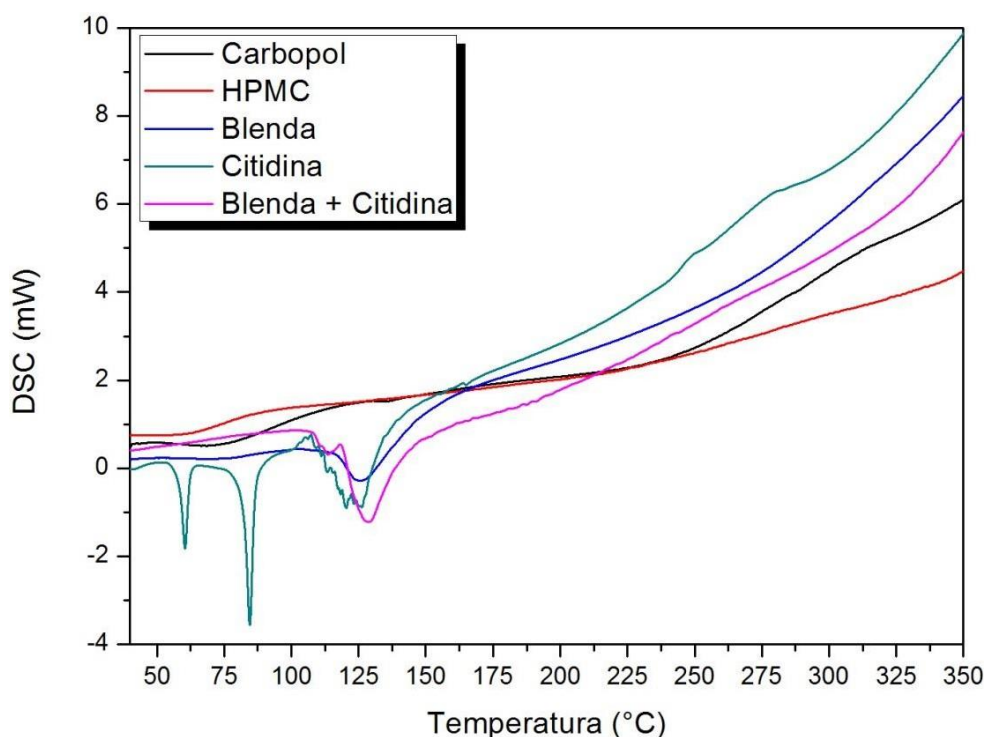
### **5.5.4 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é a técnica da análise térmica na qual mede-se a diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência em função da temperatura, enquanto a substância e o material são submetidos a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO; GIOLITO, 1980). Essa técnica permite a identificação das temperaturas de transição vítrea, de fusão e de recristalização de polímeros, o que permite a verificação de possíveis alterações na estrutura do material em função do processamento realizado (DUARTE BYRRO et al., 2009), de modo que tais informações são expressas pela curva de DSC.

Pela análise de calorimetria exploratória diferencial foi possível elucidar o comportamento térmico da CTD, dos polímeros HPMC K100 e carbopol 940 separadamente, da MEs branca e da MEs contendo a CTD. A figura 25 apresenta o gráfico das curvas de DSC referentes aos polímeros e aos fármacos sobrepostas. Os resultados indicam que não houve interação entre os compostos que provocasse alteração das suas propriedades físico-químicas, uma vez que a curva de DSC referente às MEs contendo a CTD é resultante do somatório das curvas referentes às matérias-primas puras.



**Figura 25 – Sobreposição das curvas DSC do carbopol (preto), HPMC (vermelho), citidina (verde), microesferas da blenda branca (azul) e microesferas da blenda contendo a citidina (rosa), em atmosfera dinâmica de nitrogênio.**



É possível observar nas curvas do Carbopol (preto) e HPMC (vermelho) ligeiros desvios na linha de base em temperaturas entre 50 e 100°C, que podem estar associados à evaporação de água, uma vez que ambos os polímeros são hidrofílicos. A curva da blenda, em azul, apresenta um notável evento endotérmico se comparada às curvas dos polímeros puros, o que fornece indícios da ocorrência de reticulação do Carbopol a partir da correção do pH. Ainda, a intensificação do pico endotérmico da blenda com a citidina (rosa) pode ser a associação do pico referente ao processo de reticulação, que aparece na curva da blenda branca, à CTD pura. Esses resultados sugerem que não só houve encapsulação da CTD pelas MEs da blenda polimérica, como também o processo de reticulação iônica das partículas foi bem sucedido.

## 5.6 CONCLUSÃO

As MEs compostas por uma blenda polimérica à base de HPMC K100 e carbopol 940 foram produzidas pelo método de emulsificação simples A/O. As análises de caracterização evidenciam a formação de partículas maiores, de aproximadamente 80 µm de diâmetro, com formato não definido e rugoso e o potencial zeta alto e negativo é indicativo de estabilidade da suspensão. O teor de encapsulação foi avaliado com a CTD, fármaco análogo ao CDV, e mostrou resultado satisfatório, chegando a aproximadamente 50% de encapsulação. A utilização da CTD fez-se necessária para otimização do processo, devido à pouca disponibilidade do CDV. A encapsulação foi confirmada pela análise de EDS realizada em conjunto com a MEV, que identificou a presença do elemento fósforo proveniente do grupo fosfonato da CTD, e também pela análise térmica, pela qual obteve-se uma curva DSC que sugere não só a encapsulação da CTD pelas MEs, como fornece indícios de que o processo de reticulação iônica empregado para aumentar as ligações cruzadas do carbopol na formulação foi eficaz. Dada a semelhança química entre a CTD e o CDV, sugere-se que os resultados obtidos pelas análises da formulação contendo a CTD possam ser reproduzidos com o CDV, contudo, estudos posteriores com o CDV, bem como a realização de um perfil de liberação *in vitro* da formulação, são necessários para confirmar essa hipótese.

**6   CAPÍTULO II, PARTE 3: CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DOS SISTEMAS  
POLIMÉRICOS DESENVOLVIDOS**

---

## 6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1.1 Materiais

Ovos embrionários; incubadora automática digital Premium Ecológica<sup>®</sup>, Brasil; PBS estéril; bevacizumabe 500 µg/mL; cidofovir 0,7 µM; MEs de PLGA brancas 0,65 mg; MEs da blenda polimérica branca e contendo o fármaco 0,65 mg; formaldeído 10%; estereomicroscópio Motic<sup>®</sup> equipado com câmera Motic Cam<sup>®</sup>.

### 6.1.2 Métodos

#### 6.1.2.1 Avaliação da toxicidade em membrana corioalantoica (MCA)

A membrana corioalantoica de embrião de galinha (MCA) é formada por uma densa rede de artérias e veias que funciona como órgão de respiração para o embrião. O desenvolvimento do embrião até o momento da eclosão dura 21 dias, sendo que MCA é formada entre os dias 4 e 6, e continua a se proliferar e diferenciar até o dia 8, formando uma rede de capilares que realizam as trocas gasosas com o ambiente (YUAN et al., 2014).

Devido ao arranjo planar dessa microvasculatura e da sua proximidade com a superfície, a MCA tem sido um modelo bastante utilizado no estudo de processos biológicos, principalmente naqueles que envolvem a angiogênese (DIMITROPOULOU et al., 1998). Em organismos em desenvolvimento, a angiogênese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes, é uma etapa essencial para o desenvolvimento de novos tecidos. Já no caso de organismos adultos, a maioria dos tecidos normais carece de angiogênese fisiológica substancial. Assim, a angionêse em organismos adultos pode estar relacionada à cura de feridas, artrite reumatoide, endometriose, retinopatia diabética, degeneração macular, desenvolvimento de tumor e processos inflamatórios em geral (NORRBY, 2006).

Devido a tais características, são encontrados diversos relatos na literatura sobre o uso desse modelo *in vivo* para a avaliação da atividade, biocompatibilidade, bem

como da toxicidade de fármacos (RIBATTI, 2014).

Para o estudo da biocompatibilidade e possível toxicidade do CDV e das micropartículas poliméricas, os ovos embrionários, que chegaram no terceiro dia de desenvolvimento, foram incubados em uma incubadora automática digital (Premium Ecológica<sup>®</sup>, Brasil), figura 26, à temperatura de 37°C e 60% de umidade relativa do ar, em posição horizontal sob agitação constante.

**Figura 26 – Incubadora automática digital**

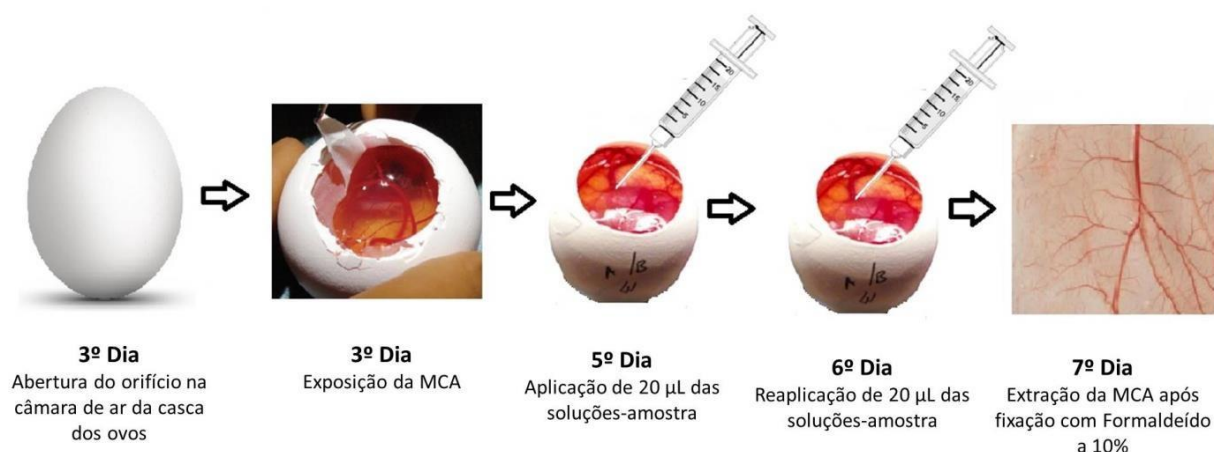


No terceiro dia do desenvolvimento embrionário, realizou-se a abertura de um orifício de aproximadamente 1 cm de diâmetro na região da câmara de ar da casca dos ovos. A membrana interna da casca foi removida para a exposição da MCA e o orifício foi vedado com fita adesiva transparente. Após a realização desse procedimento, os ovos foram acondicionados, em posição vertical, na incubadora, onde permaneceram até o final do estudo. As amostras foram aplicadas na MCA no quinto dia de desenvolvimento, e reaplicadas no sexto dia, conforme consta no quadro 8. No sétimo dia de desenvolvimento, quinto e último dia do estudo, as MCAs foram fixadas com solução de formaldeído a 10%, por 10 minutos, e em seguida extraídas e levadas a um estereomicroscópio (Motic<sup>®</sup> equipado com câmera Motic Cam<sup>®</sup>), que foi utilizado para fotografar as membranas. As etapas são esquematizadas na figura 27.

**Quadro 8 – Relação dos grupos do experimento da membrana corioalantoica de embrião de galinha (MCA) e dos respectivos tratamentos**

Amostras	Tratamentos
Controle positivo – PBS pH = 7,4	-
Controle negativo – Bevacizumabe	500 µg/mL
Solução de cidofovir	0,7 µM
MEs de PLGA brancas	0,65 mg da formulação
MEs blenda brancas	0,65 mg da formulação
MEs blenda contendo CDV	0,65 mg da formulação

**Figura 27 – Fluxograma do ensaio da membrana corioalantoica de embrião de galinha (MCA)**



Fonte: adaptado de (OZCETIN, 2013; BURNS, 2008)

As imagens foram obtidas pelo *software* Motic Images Plus 2.0, com um aumento padronizado de 20X. Os vasos da MCA foram analisados e quantificados pelo programa ImageJ, sendo que o plugin Color Threshold foi utilizado para transformar as imagens em preto e branco, nas quais os tons mais escuros correspondem à cor vermelha dos vasos sanguíneos, enquanto que as áreas brancas representam a ausência de vasos. O plugin *Analyze Particles* foi utilizado para quantificar a área referente aos vasos sanguíneos em pixels.

Os resultados obtidos foram expressos como percentual ± desvio padrão, e os

resultados encontrados para o grupo controle (que foram fixados a 100%) foram comparados com aqueles encontrados para os diferentes tratamentos. A análise de variância foi feita por ANOVA e a diferença entre os grupos (n=6) pelo teste de Tukey, utilizando *software* GraphPad Prism<sup>®</sup>5.

#### **6.1.2.2 Avaliação histológica da resposta inflamatória em prega vocal de coelho após injeção local de CDV e das MEs de PLGA**

O PLGA foi o polímero sintético escolhido para o preparo dessa formulação devido às suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, que já são bem descritas na literatura (CHEN et al., 2013). No entanto, foi necessário verificar a resposta do organismo à presença das MEs de PLGA, de modo que, nesse caso, a biocompatibilidade foi avaliada pela presença ou não de eventos inflamatórios locais após a administração da formulação.

Para a realização do estudo, os coelhos da raça *New Zealand*, pesando 2,0 Kg, foram sedados e anestesiados com ketamina e xilazina, por injeção intramuscular na região posterior da coxa, conforme estabelecido em projeto aprovado pelo CETEA.

Os animais (n=12) foram divididos em 2 grupos: 6 coelhos receberam a injeção local de solução de CDV, na concentração de 75 mg/mL, e os outros 6 coelhos receberam a injeção local de suspensão das MEs de PLGA brancas, em concentração não definida. Esses dois grupo foram, ainda, divididos em dois momentos de análise do estudo, sendo um de 7 dias e outro de 30 dias após as injeções, e para cada um desses períodos foi mantido um coelho como controle do estudo, perfazendo um total de 2 animais controle no estudo. A relação dos grupos de tratamento com seus respectivos períodos de análise estão representados no quadro 9.

**Quadro 9 – Relação dos grupos de estudo para a realização das análises histológicas**

<b>Período de sobrevida</b>	<b>7 dias</b>	<b>Número de animais</b>	<b>30 dias</b>	<b>Número de animais</b>
Grupo 1 (n=6)	Administração de 0,2 mL de sol. de CDV (75 mg/mL)	3	Administração de 0,2 mL de sol. de CDV (75 mg/mL)	3
Grupo 2 (n=6)	Administração de 0,2 mL de susp. de MEs de PLGA brancas	3	Administração de 0,2 mL de susp. de MEs de PLGA brancas	3
<i>Animais controle</i>	-	1	-	1

Os procedimentos foram realizados pelo Dr. Danilo Rodrigues, médico otorrinolaringologista vinculado ao programa de pós-graduação do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Injetou-se 0,1 mL das amostras em cada um dos lados das pregas vocais dos coelhos, previamente anestesiados, resultando em um total de 0,2 mL por coelho. As injeções foram realizadas externamente utilizando-se uma seringa descartável para insulina com agulha 8 x 0,30 mm, sem a necessidade de tricotomia, pela apalpação da laringe do animal e identificação anatômica das cartilagens tireoide e cricoide, de modo que as pregas vocais estariam localizadas entre essas duas cartilagens. Após a realização das injeções, os animais receberam Ibuprofeno gotas, na dose de 40 mg/Kg, por via oral, para analgesia.

Para a extração das pregas vocais, após transcorridos os períodos de 7 e 30 dias, os animais foram eutanasiados e as laringes extraídas com o auxílio de tesouras cirúrgicas e bisturis, conforme exposto na figura 28. As peças foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 24 h, e enviadas a um centro de análise histológica especializado, onde foram realizados cortes de 3 µm de espessura no plano coronal ântero-posterior, passando pela porção membranosa da prega vocal. Os cortes foram, então, corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM). A principal finalidade da coloração por HE é diferenciar regiões teciduais basófilas (coradas pela hematoxilina, cor azul-roxeadado), principalmente ácidos nucleicos, de regiões acidófilas (coradas pela eosina, cor



rósea), sendo proteínas em geral. Já a coloração de Tricromo de Masson tem por finalidade distinguir células do tecido conjuntivo circundante, sendo possível diferenciar áreas de glicose (vermelhas), que representam o tecido normal, das áreas de fibrose (azuis).

**Figura 28 – Laringe de coelho *New Zealand*, em corte coronal ântero-posterior, extraída para análise histológica de biocompatibilidade. As pregas vocais estão indicadas pelas setas vermelhas**



As análises histológicas da reação inflamatória foram feitas sob microscopia óptica, utilizando microscópio virtual ScanScope VS120 (Olympus life sciences; Tóquio, Japão). Foram avaliados a intensidade e predomínio celular do processo inflamatório, neovascularização, fibrogênese e áreas de necrose, bem como a concentração de colágeno.

O infiltrado inflamatório, a fibrogênese, a neovascularização e as áreas de necrose foram avaliados conforme a sua intensidade, através de escala ponderal, e divididos em diferentes graus, conforme indicado nos quadros 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

**Quadro 10 – Escala ponderal de avaliação histológica de infiltrado inflamatório**

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>
Grau 0	Ausente
Grau 1	Leve, com esparsas células inflamatórias, sem lesão evidente
Grau 2	Moredado, com infiltrado inflamatório difuso em lâmina própria, sem formação de agregados inflamatórios, com lesão focal de células epiteliais caracterizadas por desorganização e ruptura de células epiteliais
Grau 3	Intenso, com denso infiltrado inflamatório difuso, com formação de agregados de células inflamatórias, lesão de células epiteliais caracterizada por desorganização e ruptura de células epiteliais, sendo descritos os tipos celulares predominantes: neutrófilos (N), mastócitos (M), linfócitos (L), plasmócitos (P), histiócitos (H), eosinófilos (E), linfohistiocitários (LH) e linfoplasmocitário (LP)

**Quadro 11 – Escala ponderal de avaliação histológica de fibrogênese**

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>
Grau 0	Ausente
Grau 1	Leve
Grau 2	Moderada
Grau 3	Intensa

**Quadro 12 – Escala ponderal de avaliação histológica de neovascularização**

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>
Grau 0	Ausente
Grau 1	Leve

**Quadro 13 – Escala ponderal de avaliação histológica de áreas de necrose**

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>
Grau 0	Ausente
Grau 1	Leve

### **6.1.2.3 Avaliação qualitativa da aderência das MEs de PLGA e da blenda de HPMC e carbopol radiomarcadas com <sup>99m</sup>Tc nas pregas vocais de coelhos New Zealand**

A fim de verificar se as partículas desenvolvidas cumpririam a principal proposta

desse projeto, as MEs de PLGA e da blenda e o CDV foram radiomarcados com o  $^{99m}\text{Tc}$ . O processo de radiomarcção do CDV foi realizado conforme protocolo já apresentado no capítulo I dessa dissertação. Para as MEs, o mesmo protocolo foi seguido, sendo que foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de MEs para a radiomarcção. A complexação entre as MEs e o  $^{99m}\text{Tc}$  é possível, uma vez que assim como o CDV, o PLGA, a HPMC e o carbopol possuem em suas estruturas grupos ácidos doadores de elétrons que se quelam com o tecnécio, espécie deficiente de elétrons. A eficiência da radiomarcção foi determinada pela quantificação das impurezas  $^{99m}\text{TcO}_4$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$ .

Para a realização do estudo, os coelhos da raça *New Zealand*, pesando 1,5 Kg, foram sedados e anestesiados com ketamina e xilazina, por injeção intramuscular na região posterior da coxa, conforme estabelecido em projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o nº 184/2017 (Anexo I). Os animais (n=9) foram submetidos às injeções locais na prega vocal dos compostos radiomarcados, sendo que eles foram divididos em 3 grupos: 3 coelhos receberam a injeção de CDV radiomarcado com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -CDV), 3 coelhos receberam a injeção das MEs de PLGA radiomarcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -PLGA) e 3 coelhos receberam a injeção das MEs da blenda radiomarcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -blenda). Foi injetada em cada animal uma atividade de aproximadamente 4 mCi.

Injetou-se 0,1 mL das amostras em cada um dos lados das pregas vocais dos coelhos, resultando em um total de 0,2 mL por coelho. As injeções foram realizadas externamente, sem a necessidade de tricotomia, pela apalpação da laringe do animal e identificação anatômica das cartilagens tireoide e cricoide, de modo que as pregas vocais estariam localizadas entre essas duas cartilagens. Após a realização das injeções, os animais receberam Ibuprofeno gotas, na dose de 40 mg/Kg, por via oral, para analgesia.

Os animais foram então levados à gama-câmara para aquisição das imagens cintilográficas, nos tempos de 1, 4, 8 e 24 h após as injeções, de modo a verificar a cinética de depuração dos compostos injetados e assim, comparar, qualitativamente, a permanência das MEs nas pregas vocais em relação à solução de CDV.

## 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.2.1 Avaliação da citotoxicidade em membrana corioalantoica (MCA)

A biocompatibilidade dos polímeros utilizados neste projeto já é bem descrita na literatura, entretanto, buscou-se avaliar uma possível citotoxicidade dos sistemas desenvolvidos *in vivo* pelo ensaio da membrana corioalantoica (MCA), o qual apresenta-se como um ensaio de baixo custo, reprodutível e confiável.

Durante o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, embriões de galinha são utilizados para avaliar a atividade ou toxicidade de um fármaco ou até mesmo de outros constituintes da formulação, como por exemplo os polímeros. A toxicidade pode ser avaliada em termos da morte do embrião ou da ocorrência de efeitos adversos na MCA, incluindo inflamação e neovascularização (VARGAS et al., 2007). Sabe-se que a implantação de sistemas à base de biomateriais dá início a respostas biológicas que podem resultar no desenvolvimento de um processo inflamatório, geralmente acompanhado por angiogênese e, por isso, faz-se necessária a avaliação da ocorrência desses processos (ZWADLO-KLARWASSER et al., 2001).

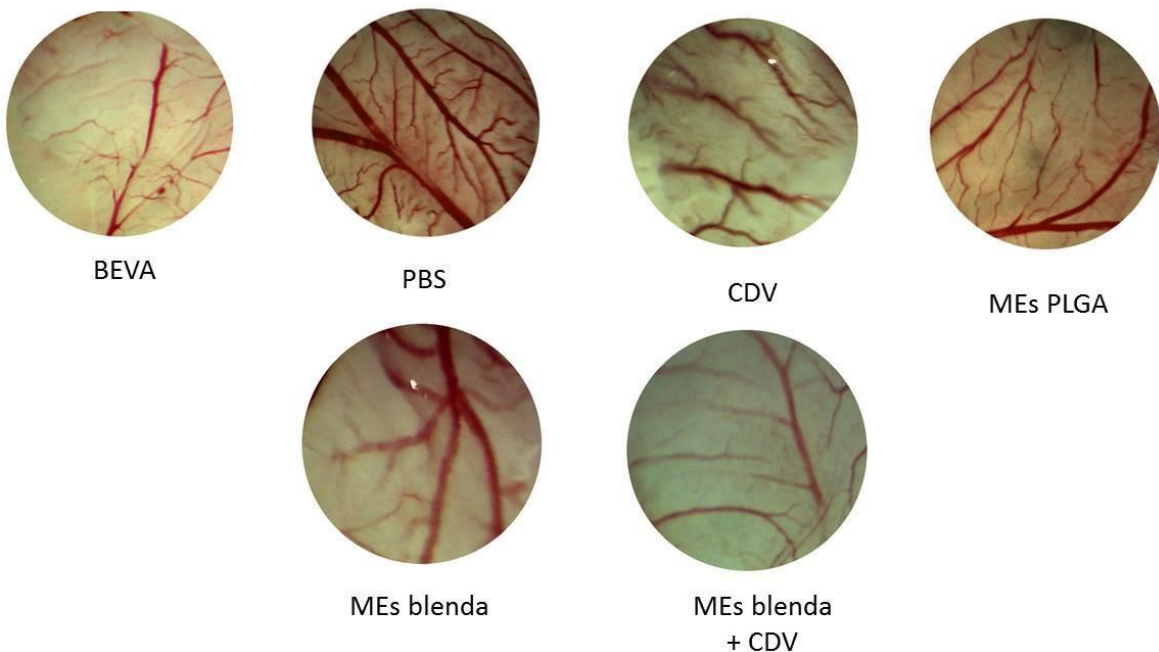
A membrana corioalantoica fornece um modelo de perfusão sanguínea que simula a microvasculatura e a camada de lâmina própria superficial das pregas vocais humanas. Assim, pelo ensaio da MCA, é possível prever o comportamento do CDV e das formulações propostas em pacientes, o que justifica a relevância desse estudo (BROADHURST et al., 2007).

A quantificação da microvasculatura presente na MCA após transcorridos os dias de estudo com os respectivos tratamentos permitiu verificar a toxicidade do CDV e dos sistemas desenvolvidos em relação ao tampão PBS, que atuou como controle da vascularização normal da MCA. A Figura 31 contém as imagens da MCA, referentes a cada grupo de tratamento, logo após serem extraídas ao final do estudo. O bevacizumabe, que foi utilizado como um controle negativo da angiogênese, é um anticorpo monoclonal humanizado que, ao se ligar às isoformas do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), inibe a sua ligação aos receptores

presentes na superfície das células endoteliais, o que inviabiliza o processo de angiogênese (AISENBREY et al., 2007). A sua utilização nesse estudo teve por objetivo demonstrar a ação de um composto com propriedade antiangiogênica, a fim de comparar e verificar se o CDV ou as MEs de PLGA também apresentam essa propriedade. De modo geral, buscou-se avaliar se há algum tipo de interferência dos compostos testados na microvasculatura da MCA, podendo o resultado indicar aumento, diminuição ou inalteração da microvasculatura.

Na tabela 7 são apresentados os percentuais de vasos sanguíneos da MCA dos grupos de tratamento em relação ao grupo controle, que foi fixado em 100%. Na figura 29 é apresentado o gráfico que expressa as porcentagens de vasos sanguíneos na MCA de acordo com os diferentes tipos de tratamento.

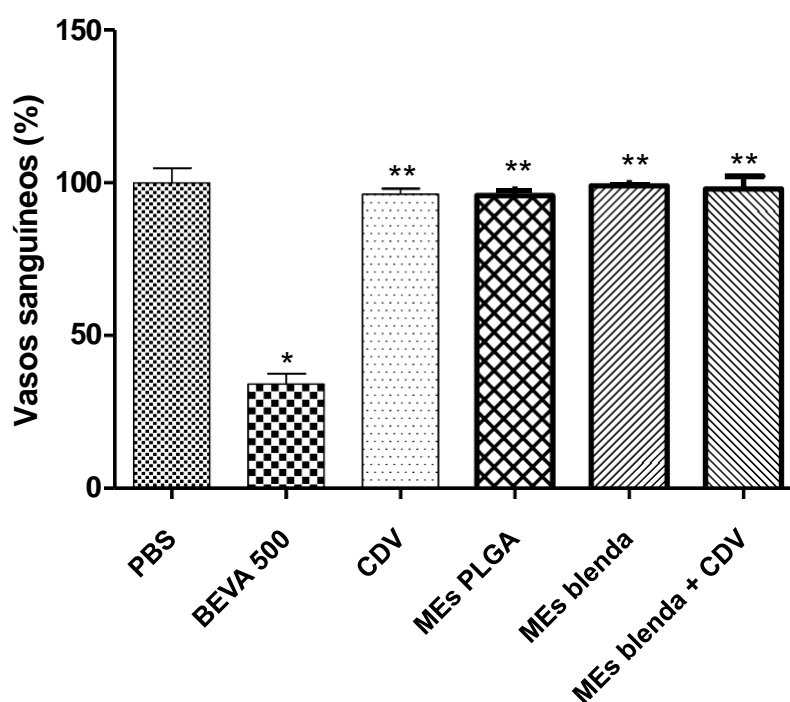
**Figura 29 – Imagens da membrana corioalantoica (MCA) de embriões 7 dias de vida que foram submetidos aos diferentes grupos de tratamento analisados**



**Tabela 7 – Percentual de vasos sanguíneos expressos em relação ao grupo controle fixado em 100%**

Grupo de tratamento	Média de vasos sanguíneos (%)
PBS (controle)	100
Beva 500 µg/mL	44,4
CDV (0,7 µM)	96,2
MEs PLGA (0,65 mg)	95,9
MEs blenda (0,65 mg)	99,0
MEs blenda contendo CDV (0,65 mg)	97,9

**Figura 30 – Ensaio de membrana corioalantoica realizado com PBS (controle), bevacizumabe (500 µg/mL), cidofovir (0,7 µM), microesferas de PLGA (0,65 mg da formulação), microesferas da blenda branca (0,65 mg da formulação) e microesferas da blenda contendo cidofovir (0,65 mg da formulação). O percentual de vasos sanguíneos do grupo tratado foi expresso em relação ao percentual do grupo controle, fixado em 100%. \* Significativamente diferente do grupo controle. \*\* Significativamente diferente do grupo tratado com bevacizumabe (500 µg/mL). (P<0,05)**



Nota-se que os ovos tratados com o bevacizumabe apresentaram uma redução significativa na vascularização da MCA. Em contrapartida, houve diferença significativa também entre todos os sistemas em relação ao bevaizumabe, o que comprova a ausência de atividade antiangiogênica nesses compostos, ao menos nas concentrações testadas.

Por não haver atividade angiogênica estabelecida, o tratamento dos ovos com o PBS reflete a vasculatura normal da MCA. Como não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos testados e o PBS, pode-se inferir que nem as MEs poliméricas, nem o CDV, induziram aumento da vascularização da MCA. Assim, existindo a correlação entre neovascularização e inflamação, conclui-se que, nas concentrações testadas, as MEs de PLGA e da blenda, bem como o CDV, não induziram o estabelecimento de um processo inflamatório agudo e, portanto, não apresentam citotoxicidade.

Já foi demonstrado que o CDV apresenta potente atividade contra lesões causadas por vírus oncogênicos, devido a uma possível atividade antitumoral do fármaco. Com o objetivo de investigar o mecanismo da atividade antitumoral do CDV, avaliou-se o efeito do CDV na angiogênese e na proliferação de células endoteliais, em modelo *in vivo* de hemangioma, que é um tumor benigno causado pela mal formação de vasos sanguíneos. Considerando-se que o crescimento tumoral é determinado pelo balanço entre proliferação celular e apoptose, podendo ser modulado pela angiogênese, sugeriu-se que o CDV poderia exercer sua atividade antitumoral por indução de morte celular por apoptose ou pela inibição da proliferação de vasos sanguíneos (LIEKENS et al., 2001). Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* confirmaram a indução da apoptose das células endoteliais pelo CDV de forma dose-dependente, enquanto que o ensaio da MCA demonstrou que, apesar de o CDV ter prevenido o desenvolvimento de hemangioma nos embriões, a vascularização da MCA não foi afetada em nenhuma das doses testadas, sugerindo que o CDV não apresenta atividade antiangiogênica (LIEKENS et al., 2001).

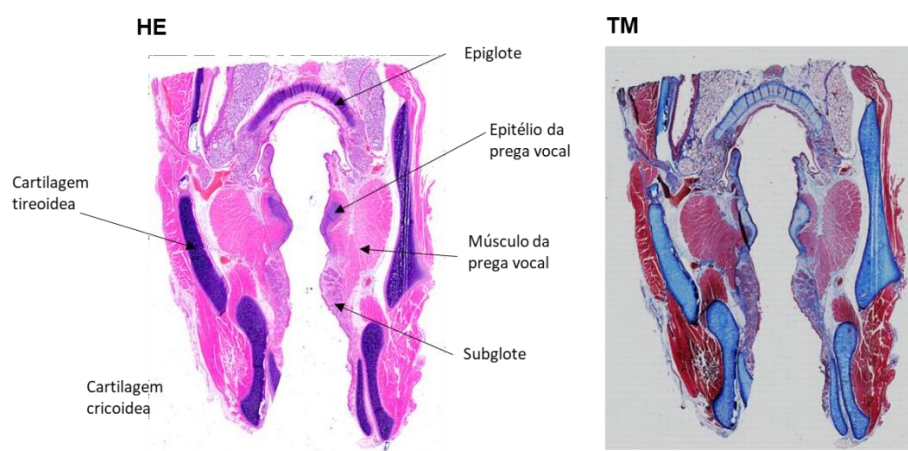
Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com o exposto por Liekens e colaboradores e mostram que o uso do CDV livre, bem como das MEs desenvolvidas não provocam alteração das condições fisiológicas das pregas vocais

na laringe. Estudos de maior duração podem ser necessários para avaliação da biocompatibilidade a longo prazo.

### 6.2.2 Avaliação histológica da resposta inflamatória em prega vocal de coelho após injeção local de CDV e das MEs de PLGA

A análise histológica da laringe extraída dos animais foi realizada pela classificação, em escala ponderal, do infiltrado inflamatório, fibrinogênese, neovascularização e áreas de necrose, como demonstrado nos quadros 14, 15 e 16, referentes aos grupos controle, tratamento com o CDV e com as MEs de PLGA, respectivamente. As imagens de microscopia óptica, obtidas após coloração das lâminas histológicas em HE e TC, também demonstradas nas figuras 31, 32 e 33.

**Figura 31 – Corte histológico da laringe de coelho *New Zealand* do grupo controle em coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM)**



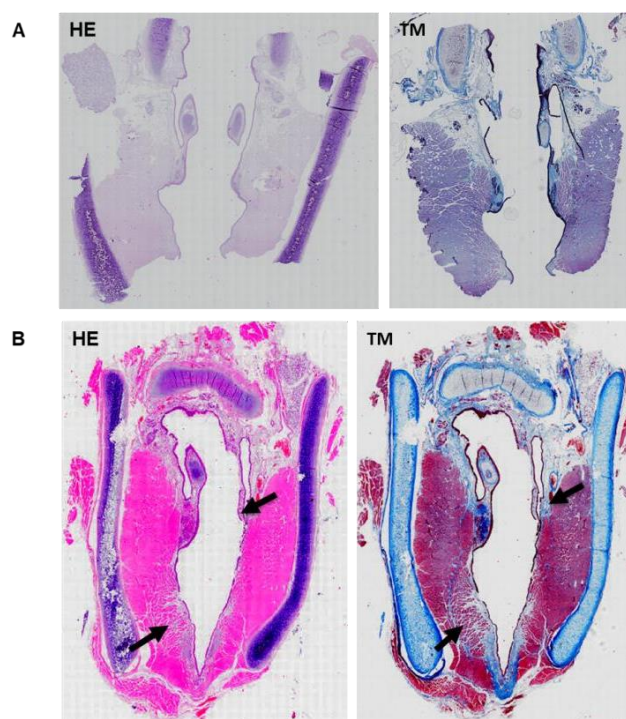
**Quadro 14 – Análise histológica da laringe de coelhos *New Zealand*, em escala ponderal, do grupo controle**

CONTROLE				
Classificação				
Período	Inflamação	Fibrose	Neovascularização	Necrose
7 dias	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
30 dias	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0



As análises histológicas do grupo controle foram realizadas em animais que não sofreram nenhum tipo de intervenção. Como mostrado na figura 31, não há nenhum tipo de alteração, de modo que as características observadas representam a histologia do tecido sadio da laringe do coelho, atuando, portanto, como parâmetro de comparação às análises dos grupos tratados.

**Figura 32 – Corte histológico da laringe de coelho *New Zealand* do grupo tratado com cidofovir no período de 7 (A) e 30 dias (B) após as injeções, em coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). As setas indicam área de intensa fibrose, com pouca reação inflamatória local.**



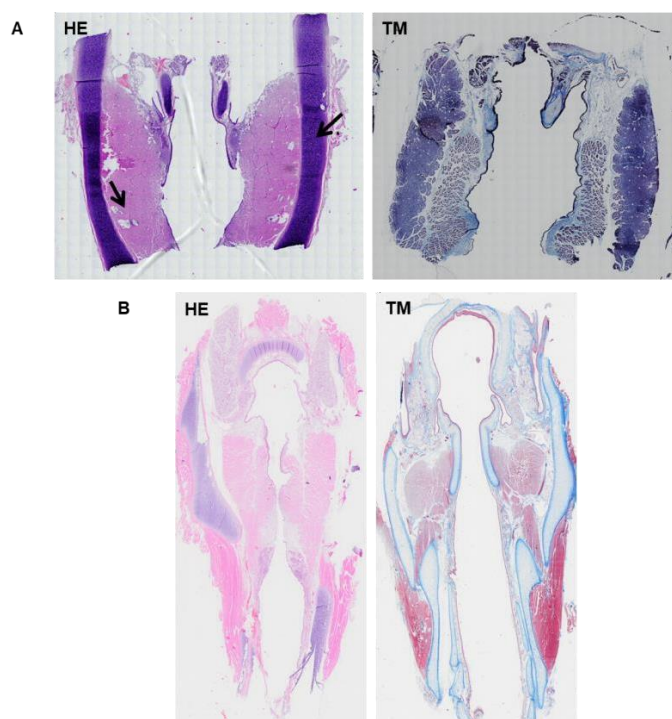
**Quadro 15 – Análise histológica da laringe de coelhos *New Zealand*, em escala ponderal, do grupo tratado com o cidofovir**

CIDOFOVIR				
Classificação				
Período	Inflamação	Fibrose	Neovascularização	Necrose
7 dias	Grau 1	Grau 0	Grau 0	Grau 1
30 dias	Grau 1	Grau 3	Grau 0	Grau 0

A imagem referente ao período de 7 dias (figura 32 A) após a administração da

solução de CDV apresenta leve infiltrado inflamatório, com sinais de necrose e liquefação tecidual, podendo corresponder ao sítio de infiltração do CDV. Já no período de 30 dias, apesar de não ter havido exacerbação do processo inflamatório, nem a presença de necrose e neovascularização, houve intenso estabelecimento de fibrose, como indicado pelas setas na figura 32 B.

**Figura 33 – Corte histológico da laringe de coelho *New Zealand* do grupo tratado com as microesferas de PLGA no período de 7 (A) e 30 dias (B), em coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). As setas indicam áreas com desprendimento do estroma.**



**Quadro 16 – Análise histológica da laringe de coelhos *New Zealand*, em escala ponderal, do grupo tratado com as microesferas de PLGA**

MEs DE PLGA				
Classificação				
Período	Inflamação	Fibrose	Neovascularização	Necrose
7 dias	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 1*
30 dias	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0

De maneira geral, a administração das MEs de PLGA não provocou alterações

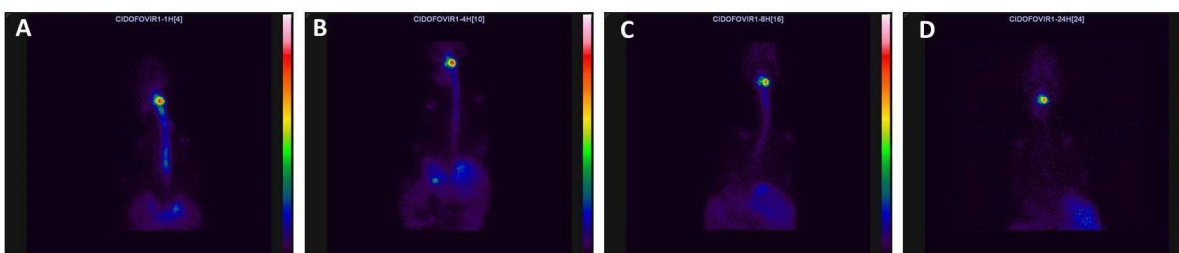
histológicas na laringe em nenhum dos períodos analisados. Na figura 33 A, há uma área com maior desprendimento do estroma, como indicado pela seta, podendo se tratar de uma necrose correspondente ao sítio de infiltração das partículas. Entretanto, como não é possível saber ao certo o real local da incisão, essa hipótese não pode ser comprovada.

### **6.2.3 Avaliação qualitativa da aderência das MEs de PLGA e da blenda de HPMC e carbopol radiomarcadas com $^{99m}\text{Tc}$ nas pregas vocais de coelhos *New Zealand***

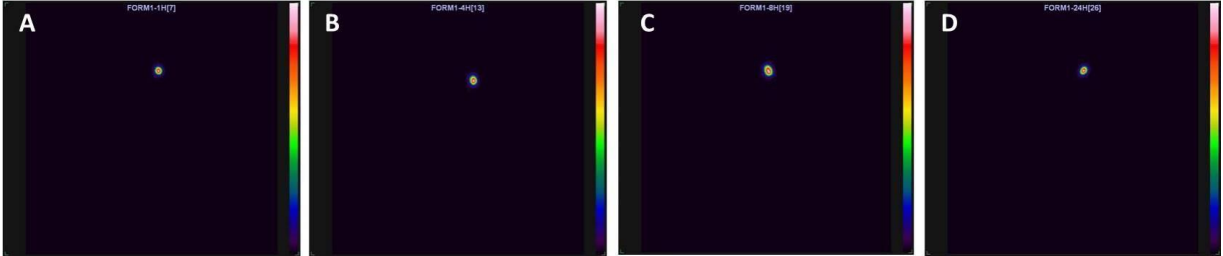
A fim de comprovar que a formulação desenvolvida cumpriria o principal objetivo deste projeto, o qual consiste na permanência prolongada das MEs poliméricas nas pregas vocais para modular a liberação do fármaco e controlar o reaparecimento das lesões causadas pelo HPV, realizou-se a marcação das micropartículas brancas com  $^{99m}\text{Tc}$  para obter imagens cintilográficas que mostrassem a permanência ou não das MEs no local desejado. O mesmo procedimento foi realizado com a suspensão das MEs de PLGA e da blenda com uma solução de CDV, para comparar a eficácia do sistema proposto em relação ao convencional, usado atualmente na clínica.

É mostrado nas figuras 34, 35 e 36 o comportamento do CDV, das MEs de PLGA brancas e das MEs da blenda brancas, radiomarcados, na laringe dos coelhos *New Zealand*, ao longo do tempo.

**Figura 34 – Imagens cintilográficas adquiridas em gama câmara evidenciando o comportamento da solução de cidofovir radiomarcada com  $^{99m}\text{Tc}$  na laringe de coelhos *New Zealand* nos tempos de 1 (A), 4 (B), 8 (C) e 24 h (D)**



**Figura 35 - Imagens cintilográficas adquiridas em gama câmara evidenciando o comportamento das microesferas de PLGA brancas radiomarcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  na laringe de coelhos *New Zealand* nos tempos de 1 (A), 4 (B), 8 (C) e 24 h (D)**



**Figura 36 – Imagens cintilográficas adquiridas em gama câmara evidenciando o comportamento das microesferas da blenda de HPMC e carbopol radiomarcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  na laringe de coelhos *New Zealand* nos tempos de 1 (A), 4 (B) e 8 (C)**



Pela figura 34 é possível observar que logo na primeira hora após a administração local do CDV a solução começou a se extravasar e o fármaco foi sendo depurado para o estômago e logo absorvido. Esse fato é confirmado pela radiação detectada não só na traqueia do coelho até o estômago, como em todo o corpo, inclusive nos ossos, como observado na região dos ombros. Gradativamente a intensidade da radiação foi diminuindo no local da injeção do CDV, nas pregas vocais, e aumentando no estômago, de modo que ao final das 24 h (figura 34 D) de acompanhamento o sinal já estava consideravelmente mais fraco em relação ao início (figura 34 A). Essas imagens confirmam os problemas reportados pelos profissionais que atuam diariamente no controle das lesões causadas pela papilomatose laríngea recorrente.

Nas figuras 35 e 36, por outro lado, nota-se que a radiação proveniente das MEs radiomarcadas é focal e bem delimitada durante todo o período de

acompanhamento. Além disso, dada a ausência de radiação ao longo da traqueia e no estômago do animal, pode-se inferir que a diminuição no sinal da radiação é decorrente apenas do próprio decaimento do  $^{99m}\text{Tc}$  e não da absorção pela via gastrointestinal do CDV liberado pela formulação.

Seria interessante fazer o acompanhamento dos animais por um período mais prolongado a fim de verificar em quanto tempo a solução de CDV seria completamente depurada e por quanto tempo as MEs permaneceriam intactas no local de aplicação. Alguns fatores como a energia não tão alta de radiação gama emitida pelo  $^{99m}\text{Tc}$  e o seu curto tempo de meia-vida (6 h), contudo, inviabilizam o acompanhamento prolongado desse experimento, não sendo possível, por exemplo, a realização de um estudo de liberação *in vivo* a longo prazo. Ainda assim, em um período de apenas 24 h já foi possível observar a grande diferença entre o comportamento das MEs e do CDV em solução após a mesma administração por injeção local nas pregas vocais dos coelhos, resultado esse que confirma e sustenta a proposta do estudo em questão. No caso das MEs da blenda, entretanto, a radiação emitida não apresentou energia suficiente para que fosse possível obter as imagens de 24 h e, por isso, o acompanhamento das partículas ficou restrito aos tempos de 1, 4 e 8 h.

### 6.3 CONCLUSÃO

Os sistemas poliméricos desenvolvidos foram analisados *in vivo* pelo ensaio da MCA, a partir do qual confirmou-se a ausência de citotoxicidade, por este método, dos polímeros e fármacos utilizados no preparo das formulações. Pela análise histológica das pregas vocais conclui-se que, ao contrário do que foi observado para o grupo tratado com o CDV, não houve alteração das condições histológicas normais da laringe em decorrência da injeção das MEs de PLGA, comprovando a biocompatibilidade da formulação com o devido local de aplicação. O estudo da radiomarcagem do CDV e das MEs de PLGA e da blenda com  $^{99m}\text{Tc}$  evidenciou a maior permanência das formulações nas pregas vocais após a injeção local em relação à solução de CDV, o que sugere um sistema promissor no tratamento da papilomatose laríngea recorrente em relação ao tratamento usual.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

A realização deste projeto teve como principal objetivo desenvolver uma formulação baseada em sistemas de liberação biodegradáveis poliméricos, a fim de contornar as dificuldades encontradas na clínica no tratamento da papilomatose laríngea recorrente. Apesar de pouco conhecida, é uma doença de grande impacto social, uma vez que atinge principalmente crianças e adolescentes e, além de ainda não ter cura, seu tratamento é intermitente e bastante invasivo, devido ao constante reaparecimento das lesões na laringe dos pacientes. Por essas razões, a busca por alternativas ao tratamento convencional, que é constituído pela injeção intralesional do CDV, é de grande relevância para a manutenção da saúde dos pacientes acometidos pela papilomatose, principalmente no que se refere à maior eficácia do tratamento e conveniência para o paciente.

As MEs de PLGA não foram capazes de encapsular o CDV. Entretanto, pelas análises de caracterização preliminares realizadas, como distribuição de tamanho, potencial zeta e MEV, estima-se que são partículas com características adequadas para formulações à base de sistemas de liberação controlada e podem, portanto, ser utilizadas para veicular fármacos com caráter mais hidrofóbico. Assim, outros fármacos com essa característica e que apresentam atividade contra DNA vírus podem ser testados para o tratamento da papilomatose nessa formulação.

Apesar das dificuldades e limitações encontradas durante alguns experimentos, a realização deste projeto é de grande importância clínica, uma vez que fornece resultados positivos e perspectivas acerca do tratamento de uma doença pouco difundida e, por isso, pouco estudada, mas que constitui um desafio diário na área da otorrinolaringologia. A execução dos experimentos complementares, aliada aos resultados já obtidos, é um grande passo para a implementação da formulação desenvolvida na clínica como alternativa à administração intralesional da solução de CDV.

## 8 PERSPECTIVAS

As formulações de MEs poliméricas desenvolvidas cumpriram a proposta do projeto, o que pode ser confirmado pelos resultados apresentados, principalmente com relação à aderência das partículas nas pregas vocais dos animais. A ausência de citotoxicidade e a biocompatibilidade das formulações nos testes apresentados constituem fortes indícios de que as MEs à base de PLGA, HPMC e carbopol serão bem toleradas para administração em humanos. Outros estudos que avaliam a citotoxicidade da formulação, como o estudo de viabilidade celular, tanto em fibroblastos como em células do tecido epitelial da laringe, são também necessários para sustentar os resultados apresentados.

O desenvolvimento das MEs da blenda polimérica de HPMC e carbopol ocorreu como uma tentativa de contornar a não veiculação do CDV pelas MEs de PLGA. As MEs de HPMC e carbopol também apresentaram características morfológicas satisfatórias, além de terem apresentado teor de encapsulação acima de 50%. A otimização de algumas etapas no processo de produção das partículas, como frequência de agitação da emulsão e proporção entre os surfactantes utilizados, podem melhorar ainda mais a sua capacidade de carga. Além disso, é importante realizar um estudo de liberação *in vitro* para avaliar o teor de liberação do CDV pelas MEs ao longo do tempo. O uso da CTD foi necessário para a realização de grande parte do estudo devido à pouca disponibilidade do CDV; entretanto, apesar de a CTD apresentar estrutura química bastante semelhante ao CDV e de ser esperado que os resultados obtidos para a CTD sejam semelhantes ao que ocorreria com o CDV, é preciso repetir alguns dos experimentos, como a avaliação do teor de encapsulação e o MEV acoplado ao EDS, para comprovar a incorporação do CDV nas MEs de HPMC e carbopol.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, A. et al. Thermal gelation of aqueous hydroxypropylmethylcellulose solutions with SDS and hydrophobic drug particles. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 74–79, 2014.

AISENBREY, S. et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology**, v. 245, n. 7, p. 941–8, 2007.

ANDREI, G.; SNOECK, R. Cidofovir activity against poxvirus infections. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2803–2830, 2010.

AREFIN, P.; HASAN, I.; REZA, M. S. Design, characterization and in vitro evaluation of HPMC K100 M CR loaded Fexofenadine HCl microspheres. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 691, 2016.

BASHIR, S. et al. Formulation and in vitro evaluation of Nateglinide microspheres using HPMC and carbopol-940 polymers by ionic gelation method. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1229–1235, 2013.

BHADRI, V. A.; LEE-HORN, L.; SHAW, P. J. Safety and tolerability of cidofovir in high-risk pediatric patients: Short communication. **Transplant Infectious Disease**, v. 11, n. 4, p. 373–379, 2009.

BOLTEŽAR, I. et al. Adjuvant therapy for laryngeal papillomatosis. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 20, n. 3, p. 175–180, 2011.

BRABAND, H. High-valent technetium chemistry - New opportunities for radiopharmaceutical developments. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 57, n. 4, p. 270–274, 2014.

BRASIL. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. [s.l: s.n.].

BROADHURST, M. S. et al. Chick chorioallantoic membrane as a model for simulating human true vocal folds. **Annals of Otology Rhinology and Laryngology**, v. 116, n. 12, p. 917–921, 2007.



BROEKEMA, F. I.; DIKKERS, F. G. Side-effects of cidofovir in the treatment of recurrent respiratory papillomatosis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 265, n. 8, p. 871–879, 2008.

BUCHINSKY, F. J. et al. Age of child, more than HPV type, is associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. 1–8, 2008.

CARIFI, M. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: Current and future perspectives. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 11, p. 731–738, 2015.

CARUSO BROWN, A. E. et al. Pharmacokinetics and safety of intravenous cidofovir for life-threatening viral infections in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3718–3725, 2015.

CHANGEZ, M. et al. The effect of composition of poly(acrylic acid)-gelatin hydrogel on gentamicin sulphate release: In vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 4, p. 527–536, 2003.

CHAWLA, V.; SARAF, S. A. Rheological studies on solid lipid nanoparticle based carbopol gels of aceclofenac. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 293–298, 2012.

CHEN, Y. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of paclitaxel loaded in six-arm star-shaped poly(lactic-co-glycolic acid). **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4315–4326, 2013.

CHENNAMANENI, S. R. et al. Development of a Novel Bioerodible Dexamethasone Implant for Uveitis and Postoperative Cataract Inflammation. v. 167, n. 1, p. 53–59, 2013.

CHO, E. J.; HOLBACK, H. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular pharmaceuticals**, v. 10, n. 6, p. 2093–110, 2013.

COHEN-SELA, E. et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 2, p. 90–95, 2009.

COMMANDEUR, S.; VAN BEUSEKOM, H. M. M.; VAN DER GIESSEN, W. J. Polymers , Drug Release , and Drug-Eluting Stents. **Interven Cardiol**, v. 19, n. 6, p. 500–506, 2006.

CUNDY, K. C. et al. Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1247–52, 1995.

DA SILVA, C. et al. Poly-  $\epsilon$  -caprolactone microspheres containing interferon alpha as alternative formulations for the treatment of chronic hepatitis C. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1, p. 51–59, 2012.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.

DAS, B.; NAYAK, A. K.; NANDA, U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: Preparation and in vitro skin permeation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 514–517, 2013.

DASH, A.; CUDWORTH, G. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 40, n. 1, p. 1–12, 1998.

DERKAY, C. S. Task Force on Recurrent Respiratory Papillomas. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 121, n. 12, p. 1386–1391, 1995.

DERKAY, C. S.; WIATRAK, B. Recurrent respiratory papillomatosis: A review. **Laryngoscope**, v. 118, n. 7, p. 1236–1247, 2008.

DIMITROPOULOU, C. et al. The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. **Angiogenesis**, v. 2, n. 3, p. 255–63, 1998.

DUARTE, L. DA C. et al. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varreura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **The Journal of biological chemistry**, v. 30, n. 2, p. 3–15, 2003.

DUARTE BYRRO, R. M. et al. Sistemas biodegradáveis contendo acetato de prednisolona para administração orbitária. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**,

v. 72, n. 4, p. 444–450, 2009.

FERNANDES, R. S. et al. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. **Nuclear Medicine Communications**, p. 1, 2015.

FERNANDEZ-BUSSY, S. et al. Recurrent respiratory papillomatosis and bevacizumab treatment. n. 1, p. 1–7, 2017.

FIALHO, S. L. et al. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891–896, 2003.

FLORESCU, D. F. et al. Safety and Efficacy of CMX001 as Salvage Therapy for Severe Adenovirus Infections in Immunocompromised Patients. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 18, n. 5, p. 731–738, 2012.

FOSTER, D. M. Noncompartmental Versus Compartmental Approaches To Pharmacokinetic Analysis. **Principles of Clinical Pharmacology**, p. 102–130, 2007.

GOON, P. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: An overview of current thinking and treatment. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 265, n. 2, p. 147–151, 2008.

HADACZEK, P. et al. Cidofovir: A novel antitumor agent for glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 23, p. 6473–6483, 2013.

HAGHSHENAS, B. et al. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 1048–1057, 2015.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, n. 8, 1980.

KALANJERI, S. et al. Reply to: Recurrent respiratory papillomatosis and bevacizumabe treatment. p. 11–12, 2017.

KATSUTA, T. et al. Treatment with quadrivalent human papillomavirus vaccine for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: Case report and review of the literature. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 4, p. 380–

385, 2017.

KLAUSS, P. Estudo Da Obtenção De Imagens No Microscópio Eletrônico De Varredura E Espectros Na Microanálise Por Energia Dispersiva. p. 26, 2003.

KSIAZEK, J. et al. Inhaled cidofovir as an adjuvant therapy for recurrent respiratory papillomatosis. **Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 144, n. 4, p. 639–41, 2011.

KULINOWSKI, P. et al. Magnetic Resonance microscopy for assessment of morphological changes in hydrating hydroxypropylmethyl cellulose matrix tablets in situ. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 12, p. 3420–3433, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LANGE, K. et al. Development of an advanced diagnostic concept for intestinal inflammation: Molecular visualisation of nitric oxide in macrophages by functional poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1637–1641, 2017.

LEE, S. S. et al. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 2043–2053, 2010.

LIEKENS, S. et al. Inhibition of fibroblast growth factor-2-induced vascular tumor formation by the acyclic nucleoside phosphonate cidofovir. **Cancer Research**, v. 61, n. 13, p. 5057–5064, 2001.

MARERI, A. et al. Anti-viral therapy for congenital cytomegalovirus infection: pharmacokinetics, efficacy and side effects. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 29, n. 10, p. 1657–1664, 2016.

MARTÍNEZ-SANCHO, C.; HERRERO-VANRELL, R.; NEGRO, S. Vitamin A palmitate and aciclovir biodegradable microspheres for intraocular sustained release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, n. 1–2, p. 100–106, 2006.

MARTINS, K. F. **Obtenção e caracterização de microesferas do copolímero**

**PLDLA contendo Paclitaxel Obtenção e caracterização de microesferas do copolímero PLDLA contendo paclitaxel.** [s.l: s.n.].

MAUNSELL, R.; BELLOMO-BRANDÃO, M. A. Pegylated interferon for treating severe recurrent respiratory papillomatosis in a child: case report. **Sao Paulo Medical Journal**, n. 0, p. 1–6, 2017.

MCCALLUM, M. M. et al. A fluorescence-based high throughput assay for the determination of small molecule-human serum albumin protein binding. v. 406, n. 7, p. 1867–1875, 2015.

NK, C.; JAMES, A. Adjuvant antiviral therapy for recurrent respiratory papillomatosis ( Review ). n. 1, 2010.

NORRBY, K. In vivo models of angiogenesis. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 3, p. 588–612, 2006.

PAPAGIANNOPOULOU, D. Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 60, n. 11, p. 502–520, 2017.

PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 3–8, 2014.

PAWAR, D. et al. Evaluation of mucoadhesive PLGA microparticles for nasal immunization. **The AAPS journal**, v. 12, n. 2, p. 130–7, 2010.

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas : formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos Multiple emulsions : formation and application in microencapsulation of bioactive components. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 45, n. 1, p. 155–162, 2015.

POLIS, M. A. et al. Anticytomegaloviral activity and safety of cidofovir in patients with human immunodeficiency virus infection and cytomegalovirus viremia . Anticytomegaloviral Activity and Safety of Cidofovir in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection and Cyt. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 882–886, 1995.

PONTES, P. et al. Aplicação local de cidofovir como tratamento adjuvante na

papilomatose laríngea recorrente em crianças. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 5, p. 581–586, 2009.

RAHBAR, R. Role of vascular endothelial growth factor- $\alpha$  in recurrent respiratory papillomatosis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 114, p. 1358–1366, 2005.

RAMAZANI, F. et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, n. 1–2, p. 358–367, 2016.

RASMUSSEN, E. R. et al. Long-term follow-up and outcome in patients with recurrent respiratory laryngeal papillomatosis. **Danish Medical Journal**, n. December, p. 1–5, 2017.

RAUT, N. et al. Ethyl cellulose and hydroxypropyl methyl cellulose buoyant microspheres of metoprolol succinate: Influence of pH modifiers. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 3, n. 3, p. 163, 2013.

RAVI KUMAR, M. N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 3, n. 2, p. 234–258, 2000.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790–1798, 2006.

RAY, D. et al. Comparative Delivery Hydrochloride Through Synthesized Polymer: Hydrogel and Hydrogel Microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, p. 959–968, 2009.

RESOLUTIONS, B. A. X. **Quantax User Manual**. [s.l: s.n.].

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. **Experimental Cell Research**, v. 328, n. 2, p. 314–324, 2014.

RIBEIRO-COSTA, R. M. et al. Preparation of protein-loaded-PLGA microspheres by an emulsion/solvent evaporation process employing LTCC micromixers. **Powder Technology**, v. 190, n. 1–2, p. 107–111, 2009.

SAEED, S. et al. Utility of Tc-99m MDP bone SPECT in evaluation of osseous involvement in craniofacial malignancies. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**,

v. 45, n. 11, p. 1815–1819, 2017.

SAHOTA, R. S. et al. Novel method of intralesional cidofovir injection into laryngotracheal papillomata. **The Journal of laryngology and otology**, v. 125, n. January, p. 402–404, 2011.

SANTOYO, S. et al. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 107–113, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHRAFF, S. et al. American society of pediatric otolaryngology members's experience with recurrent respiratory papillomatosis and the use of adjuvant therapy. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 130, n. 9, p. 1039–1042, 2004.

SHARMA, M.; KOHLI, S.; DINDA, A. In-vitro and in-vivo evaluation of repaglinide loaded floating microspheres prepared from different viscosity grades of HPMC polymer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 6, p. 675–682, 2015.

SHCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1–20, 2003.

SILVA, S. M. C. et al. Aggregation and gelation in hydroxypropylmethyl cellulose aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 327, n. 2, p. 333–340, 2008.

SRIVASTAVA, A. K.; RIDHURKAR, D. N.; WADHWA, S. Floating microspheres of cimetidine: Formulation, characterization and in vitro evaluation. **Acta Pharmaceutica**, v. 55, n. 3, p. 277–285, 2005.

TASCA, R. A.; CLARKE, R. W. Recurrent respiratory papillomatosis. **Archives of**

**Disease in Childhood**, v. 91, n. 8, p. 689–691, 2006.

TERENCE, M. C. et al. Preparation and characterization of a polymeric blend of PVP/PVAL for use in drug delivery system. **J Biomed Nanotechnol**, v. 7, n. 3, p. 446–449, 2011.

TOMIC, I. et al. In vivo release of peptide-loaded PLGA microspheres assessed through deconvolution coupled with mechanistic approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, n. December 2017, p. 21–27, 2018.

TUNÇAY, M. et al. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: Formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 195, n. 1–2, p. 179–188, 2000.

VARGAS, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1162–1176, 2007.

VENKATESAM, N.; PINE, H.; UNDERBRINK, M. Recurrent Respiratory Papillomatosis. **Otolaryngol Clinics of North America**, v. 45, n. 3, p. 671, 2013.

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

WASHINGTON, M. A. et al. Monomer sequence in PLGA microparticles: Effects on acidic microclimates and in vivo inflammatory response. **Acta Biomaterialia**, 2017.

WIERZBICKA, M. et al. Effectiveness of cidofovir intralesional treatment in recurrent respiratory papillomatosis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 268, n. 9, p. 1305–1311, 2011.

WILCOX, L. J. et al. Diagnosis and Management of Recurrent Respiratory Papillomatosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 12, p. 1283–1284, 2014.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 298–327, 2008.



YUAN, J.-D. et al. pH-sensitive polymeric nanoparticles of mPEG-PLGA-PGlu with hybrid core for simultaneous encapsulation of curcumin and doxorubicin to kill the heterogeneous tumour cells in breast cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2018.

YUAN, Y. J. et al. Application of the chick embryo chorioallantoic membrane in neurosurgery disease. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 12, p. 1275–1281, 2014.

YUSUF, U. et al. Cidofovir for the Treatment of Adenoviral Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients. **Transplantation**, v. 81, n. 10, p. 1398–1404, 2006.

ZWADLO-KLARWASSER, G. et al. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, n. 3, p. 195–199, 2001.


**ANEXOS**

---

## ANEXO I – Ofício de aprovação para experimentação animal pela Comissão de Ética No Uso de Animais

 <b>UFMG</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<b>Prezado(a):</b>	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
<b>Protocolo CEUA:</b> 184/2017 <b>Título do projeto:</b> Obtenção de imagens cintilográficas a partir da radiomarcagem do Cidofovire de microesferas poliméricas à base de PLGA com Tecnécio99m <b>Finalidade:</b> Pesquisa <b>Pesquisador responsável:</b> Armando da Silva Cunha Junior <b>Unidade:</b> Faculdade de Farmácia <b>Departamento:</b> Departamento de Produtos Farmaceuticos	
<b>Situação atual:</b> Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião do dia 18/09/2017. Validade: 18/09/2017 à 17/09/2022 Belo Horizonte, 18/09/2017.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG <a href="https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/">https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</a>	Universidade Federal de <a href="#">Minas Gerais</a> Avenida Antônio Carlos, 8627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:ceua@prpq.ufmg.br">ceua@prpq.ufmg.br</a>

## ANEXO II – Ofício de aprovação para experimentação animal pela Comissão de Ética No Uso de Animais



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**UFMG**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 125/2017  
**Título do projeto:** DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO BIODEGRADÁVEL CONTENDO CIDOFOVIR.  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Andre Luis Branco de Barros  
**Unidade:** Faculdade de Farmacia  
**Departamento:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

**Situação atual:** Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 05/06/2017. Validade: 05/06/2017 à 04/06/2022  
Belo Horizonte, 05/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)