



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Rodrigo Henrique Saatkamp

**Avaliação do uso de monoglicerídeos como agentes compatibilizantes
do benzonidazol em matrizes de quitosana no desenvolvimento de filmes
mucoadesivos para o tratamento da doença de Chagas**

Florianópolis

2024

Rodrigo Henrique Saatkamp

**Avaliação do uso de monoglicerídeos como agentes compatibilizantes
do benzonidazol em matrizes de quitosana no desenvolvimento de
filmes mucoadesivos para o tratamento da doença de Chagas**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação
em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.
Coorientador: Prof. Thiago Caon, Dr.

Florianópolis

2024

Saatkamp, Rodrigo Henrique

Avaliação do uso de monoglicéridos como agentes compatibilizantes do benzonidazol em matrizes de quitosana no desenvolvimento de filmes mucoadesivos para o tratamento da doença de Chagas / Rodrigo Henrique Saatkamp ; orientador, Alexandre Luis Parize, coorientador, Thiago Caon, 2024.
147 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Benznidazol. 3. Quitosana. 4. Filmes. 5. Liberação controlada. I. Parize, Alexandre Luis . II. Caon, Thiago . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Rodrigo Henrique Saatkamp

Avaliação do uso de monoglicerídeos como agentes compatibilizantes do benzonidazol em matrizes de quitosana no desenvolvimento de filmes mucoadesivos para o tratamento da doença de Chagas

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 29 de novembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Vânia Rodrigues de Lima, Dra
Programa de pós graduação em química tecnológica e ambiental – FURG

Profa. Marcia Margarete Meier, Dra
UDESC/Joenville

Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.
UFSC/Blumenau

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química.

Prof. Dr. Daniel Lazaro Gallindo Borges
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho a minha
família e a minha companheira
Carime pela ajuda e força por
ter até aqui me auxiliado

AGRADECIMENTOS

A minha família, pais Marcio e Nilva, irmã Joseane, avós Ancelmo, Helga e Célia pelo apoio e suporte durante toda a jornada até aqui. E a minha companheira Carime por topar este desafio e estar ao meu lado.

Ao prof. Dr. Alexandre L. Parize pela orientação, confiança, ensinamento, apoio e amizade e todo o esforço despendido nesta jornada.

Ao coorientador prof. Dr. Thiago Caon pelas orientações, ideias, discussões e auxílio na escrita dos materiais.

A todos os meus amigos e colegas que de alguma forma participaram do processo e em especial a Mariele e Douglas pela parceria de longa data.

A Mariele, Bruna, Júlia e Gabriela pela colaboração no desenvolvimento do artigo.

Ao Laboratório POLIMAT e meus colegas, pelo apoio estrutura e todos que de alguma forma deram suporte durante os 4 anos de caminhada.

A Central de análises, em específico a técnica Natalia pelo apoio nas análises térmicas, discussões e amizade, ao prof. Adailton pelas análises de DRX e aos técnicos Glauber e Eliane pelas análises de NMR.

Ao LCME, em especial ao técnico Eduardo e meus amigos Carlos e Andressa pela operação do SEM.

Ao laboratório LTMAC (UnB) e ao prof. Marcílio pelo acolhimento e apoio em uma importante etapa do trabalho, em especial aos meus amigos Idejan, Antônia e Ana que foram parte essencial do período que permaneci em Brasília.

Aos órgãos de fomento Capes e CNPq

E a toda a estrutura do PPGQMC e da UFSC pelo apoio no doutorado.

RESUMO

A Doença de Chagas (DC) é enquadrada na classe das doenças negligenciadas, afetando milhões de pessoas pelo mundo, tendo como agravantes a difícil identificação na fase aguda e limitações no tratamento. No Brasil o Benznidazol (BNZ) administrado por via oral é o único tratamento disponível, porém o mesmo possui baixíssima eficiência na fase crônica e acarreta diversos efeitos colaterais no sistema gástrico. Objetivando a redução dos efeitos colaterais e a desistência ao tratamento sugere-se: i) novos excipientes baseados nos monoglicerídeos (MGs), Glicerol monolaurato (GML) e Glicerol monoestearato (GMS) visando aumento da solubilidade do BNZ. ii) a confecção de filmes em quitosana (QTS) carregados com BNZ para liberação através da mucosa bucal, evitando o metabolismo de primeira passagem. Os ensaios apontaram uma maior compatibilização do excipiente GML com o BNZ, devido a uma maior interação por ligação de hidrogênio. A adição de GML também levou a um aumento na solubilidade do BNZ. No preparo dos filmes foi de fundamental importância a adição de acetona e o aquecimento durante a agitação. Os resultados apontam que o BNZ ainda permanece cristalino dentro da matriz polimérica, porém o filme composto de QTS com 150 mg de BNZ e 150 mg de GML (QBL150) mostrou um aumento de 2 vezes na permeabilidade em mucosa bucal suína, quando comparado a solução controle. Quando comparado os filmes QBL150 e contendo 150 mg de ácido láurico (LA) (QBLA150) fica evidente a importância da ligação de hidrogênio no processo de permeação. A adição dos componentes não interferiu significativamente nos valores de mucoadesão quando comparadas com a quitosana. Os resultados são promissores frente a confecção de formulações farmacêuticas de baixo custo para o tratamento da DC, através da mucosa bucal.

Palavras-chave: benznidazol, monoglicerídeos, excipientes, filmes poliméricos, quitosana.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is one of the most neglected diseases, affecting millions of people around the world. Its aggravating factors are its difficult identification in the acute phase and its limited treatment. In Brazil, oral benznidazole (BNZ) is the only treatment available, but it is extremely inefficient in the chronic phase and has a number of side effects on the gastric system. In order to reduce side effects and treatment dropout, we suggest: i) new excipients based on monoglycerides (MGs), Glycerol monolaurate (GML) and Glycerol monostearate (GMS) to increase the solubility of BNZ. ii) the manufacture of chitosan films (QTS) loaded with BNZ for release through the oral mucosa, avoiding first-pass metabolism. The tests showed that the excipient GML was more compatible with BNZ, due to greater interaction by hydrogen bonding. The addition of GML also led to an increase in the solubility of BNZ. When preparing the films, the addition of acetone and heating during stirring were of fundamental importance. The results show that the BNZ still remains crystalline within the polymer matrix, but the film composed of QTS with 150 mg of BNZ and 150 mg of GML (QBL150) showed a 2-fold increase in permeability in porcine buccal mucosa when compared to the control solution. When comparing the QBL150 films and those containing 150 mg of lauric acid (LA) (QBLA150), the importance of hydrogen bonding in the permeation process is evident. The addition of the components did not significantly affect the mucoadhesion values when compared to chitosan. The results are promising for making low-cost pharmaceutical formulations for the treatment of CD through the oral mucosa.

Keywords: benznidazole, monoglycerides, excipients, polymeric films, chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lista de doenças negligenciadas e o número de registro de ocorrência pelo mundo: úlcera de Buruli, DC, dengue e chukungunya, dracunculose, boubá; tripanossomíase africana (<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>), hanseníase, oncocercose; doença de Chagas, tripanossomíase africana (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>), leishmaniose visceral, filariose linfática, raiva, esquistossomose, geohelmintoses, tracoma; equinococose, trematodioses de transmissão alimentar, leishmaniose cutânea, micetoma/cromoblastomicose/outras micoses profundas, escabiose/outras ectoparasitoses, envenenamento por picada de cobra e teníase/cisticercose. Adaptado de Boechat; Magalhaes., (2012).....	23
Figura 2 - Distribuição de casos de infecção por <i>T. cruzi</i> em magnitude mundial. Adaptado de WHO, (2013).....	25
Figura 3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> nos diferentes estágios de desenvolvimento do protozoário em hospedeiros invertebrados (triatominas) e vertebrados (mamíferos), adaptado de (de Souza; de Carvalho; Barrias, 2010-).	27
Figura 4 - Estrutura química do benzimidazol. Adaptado de Rugbank, (2020). ..	31
Figura 6. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, na forma acetilada (n) e desacetilada (m). Adaptado de (Wang <i>et al.</i> , 2013).....	45
Figura 7. Técnica de evaporação de solvente. Criado a partir de Biorender (2022).	46
Figura 8. Termogramas (perda de massa versus temperatura (a) e primeira derivada (b)) para BNZ, GML, GMS e BL50 e BE50 macerado.....	53
Figura 9. Curvas DSC de BL macerado (a), BE macerado (b), BL processado com moinho de bolas (c), componentes puros (d), BL fundido (e) e um gráfico de concentração de BNZ vs ΔH_{fus} (f). Proporção BNZ/GML: 90/10 (-·-·-), 70/30 (-·-), 50/50 (··), 30/70 (- -) e 10/90 (-). Uma barra foi adicionada aos gráficos à esquerda para facilitar a comparação das diferentes curvas DSC.....	55
Figura 10. Curvas de capacidade calorífica a pressão constante (C_p) para o BNZ puro as misturas BL 50:50 e BE 50:50 entre as temperaturas 110 e 200 °C.....	57
Figura 11. Curvas DSC e imagens de microscopia óptica com polarização cruzada para BE (a, b), GMS (c, d), BL (e, f), GML (g, h) e BNZ (i, j). Fluxo de calor para baixo (endo).....	58

- Figura 12. Difratoogramas de BNZ e MGs puros (a), bem como misturas binárias de BNZ/MG considerando diferentes métodos de processamento: BLMa (b), BLMe (c), BEMa (d) e BLMo (e). 61
- Figura 13. Espectros de infravermelho de misturas de componentes puros (a) obtidos através de fusão (b), maceração (c, d) e moagem de bolas (e). 63
- Figura 14. Análises SEM para BNZ puro (a), BNZ macerado (b), BNZ recristalizado utilizando acetona (c) GML e GMS puro (d-e) e misturas binárias (f-y). As misturas binárias foram preparadas em diferentes proporções, que aparecem na seguinte ordem de cima para baixo: 10, 30, 50, 70 e 90% de BNZ. BL foi macerado (f-j), moído (k-o) e derretido (p-t), enquanto BE foi apenas macerado (u-y). 64
- Figura 15. Espectros de RMN de ^1H de componentes puros e misturas BL e BE em acetona deuterada apresentados em duas diferentes aproximações do mesmo (a, b), bem como as estruturas químicas para GMS (c), GML (d) e BNZ (e). Os espectros completos estão apresentados na Figura 18 e Anexo 2 a 5. 65
- Figura 16. Solubilidade aparente do BNZ em tampão PBS (n=4), mistura MG/BZ macerada (BLMa e BEMa) e mistura física MG/BZ (BESo e BLSo). *indicam diferenças não estatisticamente significativas em relação ao BNZ. 67
- Figura 17. Curva DSC de benznidazol como fornecido para determinação de pureza através da equação de *van't Hoff*. 74
- Figura 18. Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H do benznidazol para verificar a presença de impurezas. 75
- Figura 19. Cromatogramas de HPLC representativos de BNZ conforme fornecido diluído em acetonitrila (linha cinza), contaminantes da mucosa oral extraídos com acetonitrila (linha amarela), BNZ e contaminantes da mucosa oral diluídos em acetonitrila (linha laranja). 77
- Figura 20. Regressão linear da curva de quantificação. 80
- Figura 21. Imagens dos agitadores utilizados, com o respectivo aumento de cada haste a) agitação por ultraagitação *turrax* e b) agitação mecânica por pás 85
- Figura 22 - Representação esquemática da câmara de difusão de Franz. Adaptado de (Franz, 1975). 89
- Figura 23. Images de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes preparados via agitação com *ultra turrax*: sem a dissolução do BNZ em acetona

(BNZT*) (a, b, c) e com a dissolução em acetona (BNZT) (d, e, f) e agitação utilizando pás (BNZP) (g, h, i).	91
Figura 24. Imagens de microscopia óptica para os filmes BNZT* (a, b), BNZT (c, d) e BNZP (e, f) sem luz polarizada (esquerda) e com luz polarizada (direita).	92
Figura 25. DSC para os filmes de quitosana e quitosana com BNZ.....	94
Figura 26. Imagens macroscópicas para os filmes sem BNZ: QTS (a), QL50 (b), QL150 (c), QL250 (d), QLA50 (e), QBLA150 (f) e QLA250 (g).	96
Figura 27. Imagens macroscópicas para os filmes QTS (a), QB50 (b), QB150 (c), QB250 (d), QBL50 (e), QBL150 (f), QB250 (g), QBLA50 (h), QBLA150 (i) e QBLA250 (j).	98
Figura 28. Imagens de microscopia óptica sem (esquerda) e com luz polarizada (direita) para os filmes QB150 (a, b), QBL150 (c, d) e QBLA150 (e, f).	100
Figura 29. Images de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes QB50 (a, b, c), QB150 (d, e, f) e QB250 (g, h, i).	100
Figura 30. Images de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes QBL50 (a, b, c), QBL150 (d, e, f) e QBL250 (g, h, i).	101
Figura 31. Images de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes QBLA50 (a, b, c), QBLA150 (d, e, f) e QBLA250 (g, h, i).	102
Figura 32. Imagens das gotas de água sobre a superfície dos filmes QTS (a), QL (b), QLA (c), QB50 (d), QB150 (e), QB250 (f), QBL50 (g), QBL150 (h), QBL250 (i), QBLA50 (j), QBLA150 (k) e QBLA250 (l) adquiridas para medida do ângulo de contato.	104
Figura 33. Espectros de infravermelho dos componentes puros BNZ, GML e LA (a) e QTS (b), assim como dos filmes nas três concentrações de BNZ: QB50, QB150 e QB250 (c), QBL50, QBL150 e QBL250 (d) e QBLA50, QBLA150 e QBLA250 (e).	106
Figura 34. Curvas de DSC para os filmes de quitosana com glicerol monolaurato (QL50 (a), QL150 (b), QL250 (c)) e ácido láurico (QLA50 (d), QLA150 (e), QLA250 (f)) em três diferentes concentrações, sem a presença de BNZ.....	108
Figura 35. Curvas de DSC para os filmes a) QB50, b) QB150 e c) QB250.....	110
Figura 36. Curvas de DSC para os filmes a) QBL50, b) QBL150 e c) QBL250.	111
Figura 37. Curvas de DSC para os filmes a) QBLA50, b) QBLA150 e c) QBLA250.	113

Figura 38. Difrátogramas para a) BNZ, b) GML e c) LA.	114
Figura 39. Difrátogramas para a) QB50, b) QB150 e c) QB250.	114
Figura 40. Difrátogramas para a) QBL50, b) QBL150 e c) QBL250.....	115
Figura 41. Difrátogramas para a) QBL50, b) QBL150 e c) QBL250.....	115
Figura 42. Ensaio de mucoadesão para os filmes.....	116
Figura 43. Perfil de permeabilidade do BNZ em mucosa bucal suína, para a solução controle (2,5 mg mL ⁻¹) (■) e os filmes de quitosana: QB150 (●); QBL150 (▲) e QBLA150 (▼). (n = 3).....	118
Figura 44. Imagens macroscópicas dos filmes após a finalização do ensaio de permeação, intumecidos: a) QB150, b) QBL150 e c) QBLA150 e secos: d) QB150, d) QBL150 e f) QBLA150.....	119
Figura 45. Micrografias dos filmes secos pós permeação QB150: (a) face superior, (b) face inferior e (c) face transversal, QLA150: (d) face superior, (e) face inferior e (f) face transversal, e QBL150: (g) face superior, (h) face inferior e (i) face transversal.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de MGs e algumas de suas propriedades físicas.....	38
Tabela 2. Diferentes proporções de monoglicerídeos e benznidazol consideradas no estudo.....	49
Tabela 3. Resumo da análise de TG, eventos de perda de peso, temperatura inicial e final e resíduo.....	54
Tabela 4. Resumo do parâmetro Flory-Huggins e ajuste dos dados.....	56
Tabela 5. Valores de temperatura e entalpias de fusão das curvas calorimétricas apresentadas nas Figuras 9d e 11.....	59
Tabela 6. Solubilidade do BNZ nos diferentes solventes determinada através de análise HPLC (n=3).....	78
Tabela 7. BNZ recuperado da mucosa oral suína por extração com água, metanol, etanol, acetonitrila e acetona.	79
Tabela 8. Valores médios de repetibilidade \pm desvio padrão para 6 repetições em três concentrações diferentes.	80
Tabela 9. A precisão do método HPLC-UV para determinação de BNZ em soluções de acetonitrila.....	81
Tabela 10. Sumarização das amostras produzidas e seus constituintes.....	85
Tabela 11. Espessura dos filmes poliméricos determinados por um micrometro em diferentes posições (n=5).....	97
Tabela 12. Valores de ângulo de contato para água sobre a superfície dos filmes.	103
Tabela 13. Valores de temperatura e entalpias de fusão das curvas calorimétricas apresentadas nas Figuras 34, 35, 36 e 37 e anexo 7.	109
Tabela 14. Parâmetros de permeabilidade do BNZ para a solução controle e os filmes de quitosana.	117

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Ajuste dos parâmetros de Flory Huggins, para as misturas BLMa, BLMo, BLMe and BEMa.	143
Anexo 2. Espectro de ^1H NMR para o GML em acetona deuterada.	144
Anexo 3. Espectro de ^1H NMR para o GMS em acetona deuterada.	144
Anexo 4. Espectro de ^1H NMR para o BL50 em acetona deuterada.	145
Anexo 5. Espectro de ^1H NMR para o BE50 em acetona deuterada.	145
Anexo 6. Resultados para a solubilidade aparente para as amostras maceradas BL e BE e amostras BL e BE sem processamento prévio (BLSo, BESo) em tampão PBS.	146
Anexo 7. Curva de DSC para o LA puro.	147
Anexo 8. Imagem de microscopia para o filme de QTS, superfície e fratura. .	147

LISTA DE ABREVIATURAS

[BNZ] – Concentração mensurada de benznidazol	IUPAC – União internacional de química pura e aplicada
ΔH – Entalpia de fusão do fármaco	J – Joule
° - Grau	J_s – Fluxo
mA – Miliamperes	LA – Ácido láurico
ACN – Acetonitrila	LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes
AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	L-HPC – Hidroxipropilcelulose de baixa substituição
ANOVA - Análise de Variância	LOD – Limite de detecção
ATR – Reflectância total atenuada	log P – Coeficiente de partição
BE – Mistura entre Benznidazol e Glicerol monoesterato	LOQ – Limite de quantificação
BL – Mistura entre Benznidazol e Glicerol monolaurato	LTMAC – Laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos e cosméticos
BNZ – Benznidazol	Ma – Mistura por maceração
C_d - Concentração inicial de fármaco na câmara doadora	MBC – Concentração bacteriana mínima
C_i – Concentração de fármaco no tempo de ordem i	MC - Concentração medida
C_p – Capacidade calorífica	Me – Mistura por fusão
C_t - Concentração de fármaco no meio receptor em cada tempo de amostragem	MGs – Monoglicerídeos
CV – Coeficiente de variação	MIC – Concentração inibitória mínima
DC – Doença de Chagas	MM – Massa molar viscosimétrica
DRX - Difração de raios-X	Mo – Mistura por moinho de bolas
DSC - Calorimetria de varredura diferencial	Mw – Massa molar
dTG – Derivada da perda de massa	N - Newton
FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	n – Número de replicatas
f_{fus} – Fusão	NADC – Desoxicolato de sódio
GML – Glicerol monolaurato	NFX – Nifurtimox
GMS – Glicerol monoestearato	nm – Nanometro
HEPES - 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetanosulfônico	NMR - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (1H) ou (^{13}C) carbono
HIV - Vírus da imunodeficiência humana	NTP - Números de pratos teóricos
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência	O/W – Emulsão óleo em água
Hz – Hertz	P - Coeficiente de permeabilidade
ICH – Conferência Internacional de Harmonização	PBS – Tampão fosfato
IgG - imunoglobulina G	PEG – Polietilenoglicol
ISO - Sensibilidade do sensor da câmara à luz	PFS - Fator de simetria de pico
	PG – Propileno glicol
	pH – Potencial hidrogeniônico
	pKa – $pK_a = - \log K_a$

PLOM - Microscopia óptica de luz polarizada	<i>T. cruzi</i> – <i>Trypanosoma cruzi</i>
PR - Resolução do pico	TC - Concentração teórica
PVAL – Polivinilalcool	TG – Análise termogravimétrica
PVP – Polivinilpirrolidona	T_g – Transição vítrea
QB – Filme de quitosana com BNZ	T_L - Tempo de latência
QBL – Filme de quitosana com BL	T_m - Temperatura de fusão do fármaco na mistura
QBLA – Filme de quitosana com BLA	T_{m° - Temperatura de fusão do fármaco puro
QL – Filme de quitosana com GML	TR - Tempo de retenção
QLA – Filme de quitosana com LA	UnB – Universidade de Brasília
Q_t – Quantidade de fármaco acumulada	UV-vis – Ultravioleta – visível
QTS – Filme de quitosana pura	V – Voltagem (kV)
R - Constante do gás ideal $8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	v/v – Proporação volume/volume
R – Substituinte genérico	V_r – Volume da solução receptora
R^2 – Coeficiente de determinação	V_s - Volume da solução da alíquota
RADs – Reações adversas	WHO – Organização mundial de saúde
rpm – Rotações por minuto	PM – Perda de massa
S – Coeficiente angular	α – Alfa
SEM - Microscopia eletrônica de varredura	β – Beta
SIV – Vírus da imunodeficiência símia	θ – Ângulo de espalhamento
So – Mistura sem processamento	μm - Micrometro
SSL – Esteoril lactato de sódio	ρ – Densidade
<i>Stubs</i> – Porta amostras para análise de SEM	σ – Desvio padrão
SUS - Sistema Único de Saúde	Φ - Fração mássica
T – Temperatura	χ – Parâmetro de Flory-Huggins

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	CAPÍTULO I	22
2.1	Revisão bibliográfica	22
2.1.1	Doenças negligenciadas	22
2.1.2	Doença de chagas	24
2.1.3	Benznidazol.....	30
2.1.4	Novas alternativas de tratamento	32
2.1.5	Excipientes	34
2.1.6	Monoglicerídeos.....	37
2.1.7	Métodos de preparos de formulações sólidas	42
2.1.8	Filmes poliméricos	43
2.1.9	Qitosana	44
2.1.10	Método de preparo dos filmes.....	45
3.	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo Geral.....	47
3.2	Objetivos específicos	47
4.	CAPÍTULO II	48
4.1	Materiais e métodos	49
4.1.1	Materiais.....	49
4.1.2	Preparação de misturas fármaco-excipiente por maceração, moinho de bolas e fusão	49
4.1.3	Caracterização físico-química.....	50
4.2	Resultados e discussão	52
4.1.4	Caracterização do estado sólido	52
4.1.5	Caracterização do estado líquido	65
4.3	Considerações parciais.....	68

5.	CAPÍTULO III	69
5.1	Materiais e métodos	70
5.1.1	Materiais.....	70
5.1.2	Caracterizações FÍSICO-QUÍMICAS.....	70
5.1.3	Validação do método cromatográfico	70
5.2	Resultados e discussões	74
5.2.1	Determinação do grau de pureza do BNZ.....	74
5.2.2	Estabelecimento das condições cromatográficas	75
5.2.3	Desenvolvimento do processo para extração de fármacos da mucosa oral	76
5.2.4	Validação do método	79
5.3	Considerações parciais.....	82
6.	CAPÍTULO IV	83
5.4	Materiais e métodos	84
5.2.5	Materiais.....	84
5.2.6	Métodos.....	84
5.5	Resultados e discussões	90
5.5.1	Seleção da metodologia de preparo dos filmes de quitosana.....	90
5.5.2	Análises macro e microscópicas dos filmes de quitosana com BNZ, GML e LA	95
5.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	100
5.5.4	Molhabilidade por ângulo de contato.....	102
5.5.5	Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)	105
5.5.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	107
5.5.7	Difrações de Raios-x	113
5.5.8	Estudo de mucoadesão estática <i>in vitro</i>	116
5.5.9	Estudo de permeabilidade do BNZ <i>ex vivo</i> em mucosa suína	117

5.6	Considerações parciais.....	121
7.	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS	124
	ANEXOS	143

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma das tantas doenças que participam da classe das doenças negligenciadas. Sua maior incidência é em regiões tropicais e de baixa renda, transmitida de forma vetorial direta pelo inseto denominado barbeiro e indiretamente por transfusões de sangue, órgãos, cana de açúcar, açai, água contaminada, entre outros. No Brasil o Barbeiro é frequentemente encontrado na estrutura das casas de barro e palha das populações ribeirinhas e nas extensas plantações de cana de açúcar.

Quando falamos da DC é importante ressaltar que qualquer pessoa em qualquer parte do mundo pode ser contagiada. É uma doença de difícil identificação na fase aguda e possui baixa taxa de eficácia no tratamento na fase crônica. O principal e mais eficiente fármaco utilizado no tratamento é o benznidazol (BNZ) por via oral na forma de comprimido, porém eficaz somente na fase aguda da doença. Além da limitação do tratamento da fase crônica, o BNZ leva a uma infinidade de efeitos colaterais, sendo estes o maior motivo na desistência do tratamento da doença. Os efeitos colaterais mais relatados são fortes náuseas (dores abdominais), dores de cabeça, problemas relacionados ao fígado e coração entre diversos outros. Diante das restrições associadas aos fármacos e formulações farmacológicas, juntamente com os múltiplos efeitos colaterais provocados pelo BNZ, torna-se imperativo explorar o desenvolvimento de novas formulações. Isso inclui a utilização de excipientes inovadores e a exploração de novas vias de administração, que sejam acessíveis e economicamente viáveis.

O presente estudo objetiva a utilização de dois monoglicerídeos (MGs) (Glicerol monolaurato (GML) e Glicerol monoestearato (GMS)) como proposta de novos excipientes para o BNZ e a obtenção de filmes de quitosana mucoadesivos carregadas com BNZ para liberação transbucal, com o intuito de diminuir a porcentagem de desistentes no tratamento da DC com BNZ por incapacidade de suportar os efeitos colaterais. Dado que as interações excipientes-fármacos têm um impacto na solubilidade do medicamento, cristalinidade e permeabilidade, as interações químicas entre BNZ e MGs foram investigadas neste trabalho. Foram exploradas como as condições de processamento (maceração, moinho de bolas, fusão e solubilização de materiais em meio líquido) dos materiais afetam as interações fármaco-excipiente, bem como as propriedades térmicas, de cristalinidade e solubilidade.

Em geral, polímeros com característica de adesão à mucosa, apresentam carga positiva e capacidade de formar ligação de hidrogênio. A quitosana, além de atender a estes requisitos é um biopolímero e se apresenta com uma forte candidata para formação de matrizes poliméricas muco adesivos carregados com um ativo hidrofóbico. A confecção de filmes de quitosana contendo BNZ surge como uma alternativa para a redução dos efeitos colaterais causados no sistema gástrico, uma vez que o mecanismo de administração será através da mucosa bucal. A elevada taxa de recristalização, elevada hidrofobicidade e baixa solubilidades do BNZ, serão os maiores desafios encontrados para produção de novas fórmulas farmacêuticas.

2. CAPÍTULO I

Revisão bibliográfica

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Doenças negligenciadas

Áreas caracterizadas por baixos indicadores sociais, econômicos e de qualidade de vida enfrentam uma prevalência de doenças consideradas negligenciadas, uma vez que recebem pouca atenção por parte de órgãos governamentais, do setor privado e, conseqüentemente, da pesquisa. Essas doenças ganham a denominação de "negligenciadas" devido à sua maior incidência em regiões de baixa renda e por apresentar indicadores insuficientes para grandes investimentos em pesquisa, produção de novos medicamentos e estratégias de controle. Doenças tropicais infecciosas como tuberculose, malária, leishmaniose, doença de Chagas, doença do sono, esquistossomose e muitas outras fazem parte do conjunto referenciado como doenças negligenciadas (Boechat; Magalhaes, 2012). De Araujo; Moreira; Aguiar, (2013) discorrem sobre a utilização da palavra negligenciada para fazer alusão a doenças que não são dignas de atenção, ressaltando a importância da comunicação no combate a estas doenças.

Estima-se que 1 bilhão de pessoas são afetadas por alguma doença tropical e mesmo assim o arsenal de fármacos para tratamento é escasso. É comum relacionar as doenças negligenciadas com pobreza, levando a um súbito desinteresse no seu cuidado e controle. A Figura 1 mostra o número de registro de casos pelo mundo das doenças negligenciadas, mostrando sua elevada incidência em países de clima tropical (Boechat; Magalhaes, 2012).

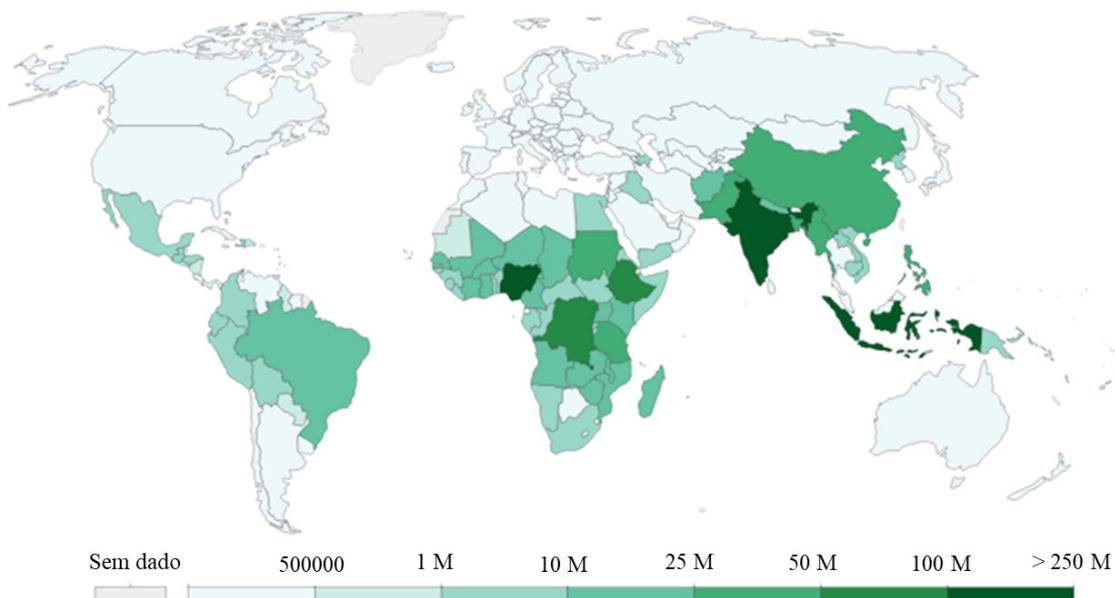


Figura 1 - Lista de doenças negligenciadas e o número de registro de ocorrência pelo mundo: úlcera de Buruli, DC, dengue e chikungunya, dracunculose, boubá; tripanossomíase africana (*Trypanosoma brucei gambiense*), hanseníase, oncocercose; doença de Chagas, tripanossomíase africana (*Trypanosoma brucei rhodesiense*), leishmaniose visceral, filariose linfática, raiva, esquistossomose, geohelmintoses, tracoma; equinococose, trematodioses de transmissão alimentar, leishmaniose cutânea, micetoma/cromoblastomicose/outras micoses profundas, escabiose/outras ectoparasitoses, envenenamento por picada de cobra e teníase/cisticercose. Adaptado de Boechat; Magalhaes., (2012).

Deste modo, fomentar o interesse da indústria farmacêutica e de entidades de pesquisa é tão importante quanto a preocupação da indústria privada, entidades governamentais e entre outras tantas, em atuar em medidas educativas, comunicativas e preventivas em torno destas doenças (Morel, 2006). A organização mundial de saúde (WHO) cita que de 2007 a 2018 os maiores investimentos foram nos setores públicos, seguido de entidades filantrópicas e por último no setor privado. Dentre as doenças mais cotadas estão HIV/AIDS, malária e tuberculose, porém de 2017 a 2018 a doença de Chagas recebeu a maior porcentagem de investimento (World health Organization, 2020).

Em 2013, na 66ª Assembleia Mundial da Saúde, foi confeccionado uma resolução de prevenção, controle, combate e erradicação de 17 doenças tropicais negligenciadas, onde é traçada uma estratégia de investimento de aproximadamente 39 bilhões de dólares de 2015 a 2030. A resolução inclui capital e estratégia para o desenvolvimento de novos

fármacos e novas medicações, e como supracitado, o aumento do investimento no combate a DC é resultado desta resolução (Van Heyningen et al., 2019). Van Heyningen et al., (2019) também citam a importância da otimização de dosagem por idade e pelas diferentes respostas terapêuticas de acordo com a localização geográfica, novos antiparasitários e novas combinações farmacológicas.

2.1.2 Doença de chagas

2.1.2.1 Aspectos Históricos e o Trypanosoma cruzi

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo parasita *T. cruzi*, é uma doença tropical e de terceiro mundo, sendo enquadrada na classe das doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013). É considerada uma doença endêmica em 21 países da América Latina, onde 6-7 milhões de pessoas estão infectadas com a doença. Resultando em uma média de 10000 mortes anuais e uma estimativa de que 75 milhões de pessoas no mundo estão suscetíveis a contração da doença (WHO, 2013) (Santos *et al.*, 2015). Aproximadamente 4,2 milhões ou 71 % dos casos de infecção são reportados no Brasil, México, Argentina e Bolívia (maior incidência). O restante dos casos estão concentrados na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, como fruto da migração de infectados de regiões endêmicas para não endêmicas (Figura 2) (Santos *et al.*, 2020). O tratamento para DC soma um montante de aproximadamente 7 bilhões de dólares por ano, provocando grande impacto social e econômico (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018), (Pinheiro *et al.*, 2017).

Os agravantes destas doenças são a limitação no tratamento e a alta taxa de transmissão, que podem ocorrer de forma vetorial, pelo inseto *Panstrongylus gemiculatus*, mais conhecido como barbeiro, e nas formas não vetoriais, através de transfusões de sangue, transfusões de órgãos, via congênita, via oral e contaminações laboratoriais (Paucar; Moreno-Viguri; Pérez-Silanes, 2016). Estes agravantes unidos a migração de indivíduos cronicamente infectados e assintomáticos resultaram-se na globalização da doença, como ressaltado anteriormente na Figura 1 e 2 (Vinuesa *et al.*, 2017a).

Segundo Coura; Borges-Pereira, (2010), inicialmente a DC tratava-se de uma doença enzoótica, transformando-se em antropozoonose durante o processo de ocupação e destruição de florestas nativas. Atitude esta que favoreceu a aproximação e o contato de animais silvestres e insetos da subfamília Triatominae com humanos. Deste modo o parasita que se encontrava no ciclo nativo, adentra no ciclo peridoméstico e doméstico, promovendo um forte agravante na disseminação da doença. O autor também conclui que a infecção natural em humanos por *T. cruzi* é limitado ao tempo e a intensidade da exposição aos insetos.

Os fatores determinantes na infecção da DC estão relacionados aos fatores iniciais da inoculação do *T. cruzi*, tais como veículo de contaminação, quantidade inicial de parasita no ato, quantidade de trimastigotas (forma não multiplicativa e infectante), linhagem do *T. cruzi*, reinfecção e a resposta do sistema imune do hospedeiro ,(Coura; Borges-Pereira, 2010; Pereira; Navarro, 2013). A contaminação em humanos ocorre através da entrada do tripomastigota transmissor por regiões lesionadas ou mucosas, infectando as primeiras células que se deparar. A proliferação é intracelular e assexuada, seguida pela contaminação de células vizinhas sadias e da corrente sanguínea, podendo atingir todos os tecidos do hospedeiro ,(Buscaglia; Di Noia, 2003; Castro; Prata; Macedo, 2005). A Figura 3 mostra uma representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi* pela via vetorial de contaminação. Uma das principais dificuldades para o controle e combate da DC é o comportamento heterogêneo da doença, que é resultado do elevado potencial de reprodução do parasita e sua contaminação.

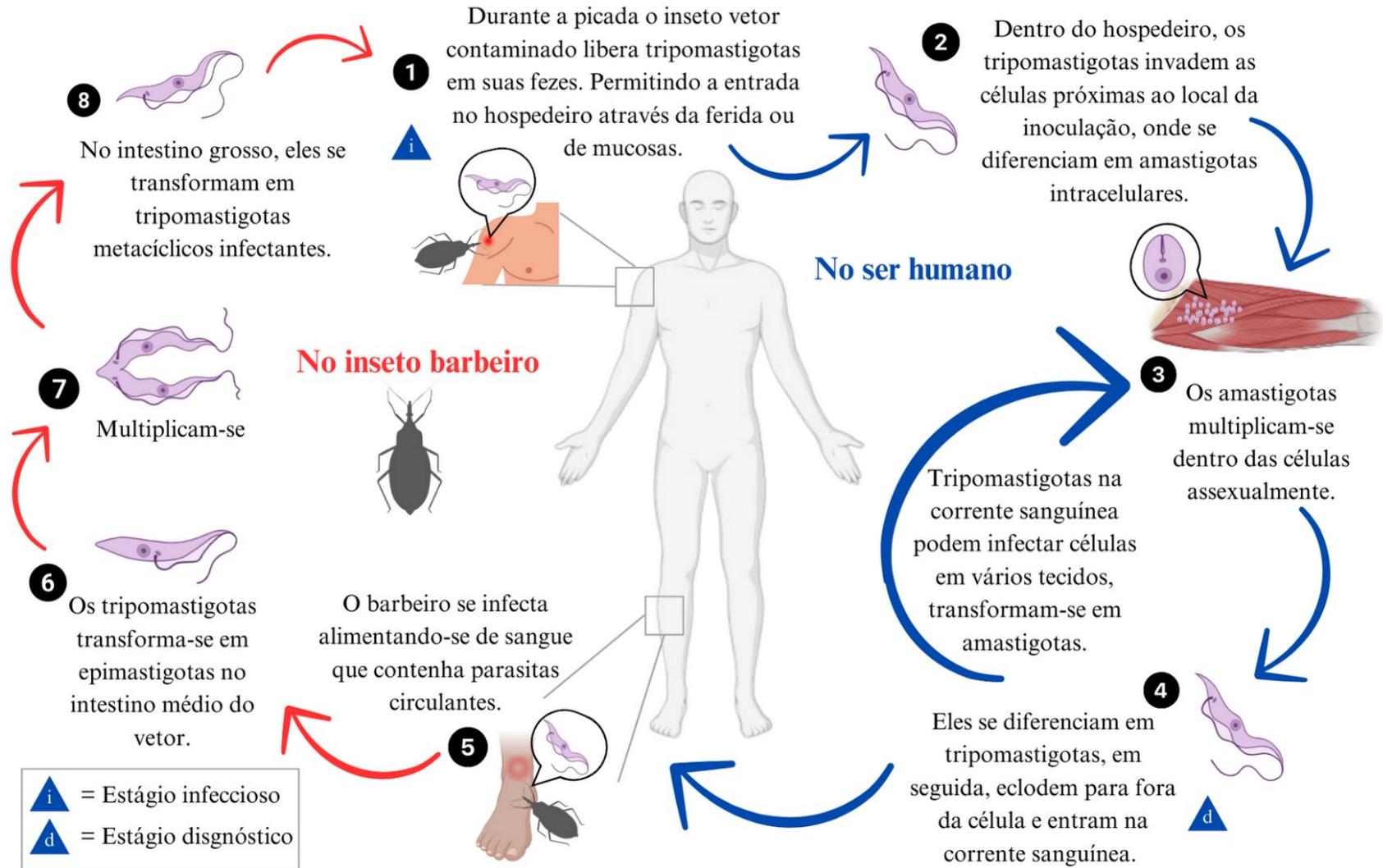


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi* nos diferentes estágios de desenvolvimento do protozoário em hospedeiros invertebrados (triatominas) e vertebrados (mamíferos), adaptado de (de Souza; de Carvalho; Barrias, 2010-).

2.1.2.2 Fases clínicas

Devido ao amplo espectro clínico da DC são encontradas diversas referências e características distintas na literatura. A forma de infecção pelo *T. cruzi* pode ser primária ou via transmissão vetorial, alterando o comportamento clínico. Na infecção primária a fase aguda é caracterizada pelo elevado grau de parasitemia e em 95% dos casos são assintomáticos. Os outros 5% podem apresentar sintomas como febre prolongada, dores de cabeça, mialgia, linfadenite, hepatomegalia, esplenomegalia, endopatia generalizada, miocardite, meningecefalite, entre outros. Geralmente os sintomas desaparecem em 60 dias mesmo sem o uso de drogas (Coura; Borges-Pereira, 2010; Pereira; Navarro, 2013; Teixeira; Nascimento; Sturm, 2006).

Quando a infecção ocorre por via de transmissão vetorial os sinais se manifestam de acordo com a porta de entrada: chagomas, quando a entrada é via pele, e sinal de Romaña, quando via conjuntiva (Lidani *et al.*, 2019). Nestes casos ocorre uma redução da parasitemia, as manifestações clínicas tendem a desaparecer espontaneamente após 4 a 8 semanas, em 90% dos casos, e a partir disto o paciente adentra na fase crônica. (Teixeira; Nascimento; Sturm, 2006) citam que 75% dos casos de fase aguda ocorrem em crianças menores de 10 anos e que a morte nesta fase é de 1:1000, geralmente relacionado a falha cardíaca, meningites e encefalites.

A fase subsequente crônica também apresenta uma gama de características, divididas em assintomáticos (fase intermediária) e sintomáticos (forma cardíaca e digestiva) (Nunes *et al.*, 2013). A fase intermediária é caracterizada por ausências de sintoma e sinais de chagas, teste de anticorpo IgG e/ou demonstração parasitológica positivos, ausência de anomalias em análises de eletrocardiograma e radiografias do coração, esôfago e intestino (Nunes *et al.*, 2013). Os indivíduos que apresentam a fase intermediária permanecem como uma fonte vitalícia de transmissão e cerca de um terço desses indivíduos evolui para a fase crônica da DC (Teixeira; Nascimento; Sturm, 2006).

Segundo os critérios reportados, independente da área geográfica, dois terços dos indivíduos levam uma vida normal. Aproximadamente 12 milhões de pessoas, entre 20 e 50 anos de idade, descobrem a DC através do teste imunológico (positivo), durante doações de sangue e processos de contratação trabalhista (Teixeira; Nascimento; Sturm, 2006). A cardiopatia chagásica é a mais registrada e suas manifestações clínicas surgem

de 5 a 15 anos após a infecção inicial. Os sintomas geralmente são arritmia, insuficiência cardíaca, bloqueio atrioventricular e de ramo e tromboembolismo. A forma digestiva crônica da doença também se apresenta como uma das manifestações mais comuns, geralmente diagnosticada por disperistalse de esôfago e cólon, podendo evoluir para a formação de megaesôfago e megacólon (Coura; Borges-Pereira, 2010; Teixeira; Nascimento; Sturm, 2006).

2.1.2.3 Tratamento

Após uma década de sua descoberta a DC ainda é um dos maiores problemas na saúde pública da América Latina, com a maior incidência de mortes dentre as doenças parasitárias. Mesmo assim o interesse em investimentos é baixo, sejam em pesquisas frente a novos tratamentos ou em formas de identificação da doença (Pinheiro *et al.*, 2017). No México apenas em 2009 o governo passou a oferecer condições de tratamento a infectados (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018).

O tratamento da DC é realizado através do uso específico dos antiparasitários Benznidazol (BNZ), Nifurtimox (NFX) e similares. O BNZ e, em alguns casos, o NFX são eficazes nos casos agudos, congêntos e de reativação por imunossupressão, já na fase crônica existem contradições frente a sua eficácia. A WHO e as Diretrizes de Práticas clínicas recomendam o uso do BNZ como primeiro tratamento devido a sua maior eficácia e tolerância pelos pacientes, e seus menores efeitos colaterais frente ao NFX (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018) Segundo Álvarez-Hernández *et al.*, (2018) ambos possuem elevada atividade tripanocida durante a fase aguda, de 100% para neonatos e de 80 a 90% para crianças e adultos, porém apresenta baixíssima eficácia durante a fase crônica.

Além da escassez de antiparasitários para o tratamento de DC, tem-se o agravante do perfil toxicológico que resulta no elevado número de efeitos colaterais severos, levando cerca de 20% dos pacientes a abandonar o tratamento (Paucar; Moreno-Viguri; Pérez-Silanes, 2016a; Sales *et al.*, 2017). Os efeitos colaterais mais reportados na literatura pelo tratamento com BNZ estão relacionados a problemas dermatológicos e cardíacos e hipersensibilidade gástrica (Molina *et al.*, 2015). Os sintomas geralmente são identificados por anorexia, astenia, dores de cabeça, distúrbio do sono, dores estomacais, polineurite, depressão da medula óssea (de Pontes *et al.*, 2010), problemas cardíacos (Wiens *et al.*, 2016), entre outros (Ferreira *et al.*, 2019; Sales *et al.*, 2017). Segundo Nunes

et al., (2013) as doenças cardíacas após uma miocardite crônica progressiva é uma das mais importantes manifestações, com uma elevada taxa de mortalidade.

Dentre os efeitos adversos ao tratamento faz-se necessário a realização de estudos em torno de novas formas e vias de administração deste fármaco, visando a redução dos efeitos colaterais como estratégia para uma maior adesão ao tratamento (Ferraz *et al.*, 2018).

2.1.3 Benznidazol

2.1.3.1 Características físico-químicas

O BNZ é um dos fármacos mais utilizados no tratamento da doença de chagas desde meados dos anos 70, apresentando uma maior eficiência na fase clínica do que na fase crônica da doença. O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), segundo maior laboratório público do Brasil, teve o direito a produção de BNZ cedido pela empresa suíça Roche em 2004, tornando-se o único produtor de BNZ do mundo (LEFAPE, 2008). No Brasil o tratamento da DC é feito com BNZ fornecido pelo LAFEPE e distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

A estrutura do BNZ (Figura 4) denominado pela IUPAC como 2-Nitro-N-(fenilmetil)-1-H-imidazol-1-acetamida, forma molecular $C_{12}H_{12}N_4O_3$ e massa molar $260,25 \text{ g mol}^{-1}$. Apresenta-se como um pó cristalino, levemente amarelado, inodoro, insípido e estável, com ponto de fusão entre 188 e $190 \text{ }^\circ\text{C}$ (Maximiano; Costa; Souza, 2010). Estudos reportam a sua baixa solubilidade em água ($0,24 \text{ mg mL}^{-1}$), moderada em acetona ($30,55 \text{ mg mL}^{-1}$) e acetonitrila ($24,74 \text{ mg mL}^{-1}$) e um aumento na solubilidade pela adição de propileno glicol e diversos surfactantes (Lamas *et al.*, 2006; Maximiano; Costa; Souza, 2010). A classificação biofarmacêutica é classe II, ou seja, reduzida solubilidade e alta permeabilidade, sendo necessário estudos em torno do aumento da dissolução do BNZ, pois a baixa solubilidade é limitante da permeabilidade e biodisponibilidade.

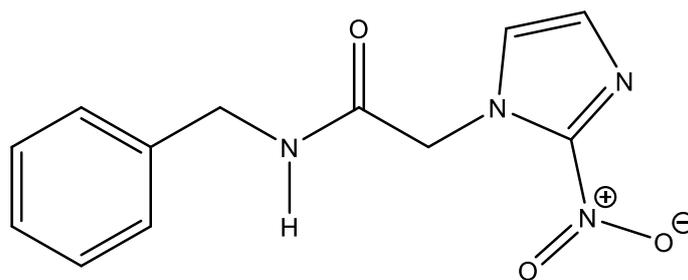


Figura 4 - Estrutura química do benznidazol. Adaptado de Rugbank, (2020).

A estrutura cristalina do BNZ pode ser descrita pela orientação de três fragmentos planares da molécula (imidazol, benzil e função acetamida), levando a formação de um ângulo diédrico. A junção das moléculas é possibilitada pela forte rede de interação intermolecular, formada por ligação de hidrogênio entre a ligação N-H e a ligação C=O (Soares-Sobrinho *et al.*, 2008). É importante ressaltar aqui que a baixa solubilidade em água é resultado do caráter hidrofóbico gerado pelo grupo benzil e a rede de empacotamento gerada por ligação de hidrogênio. Outras características físico-químicas importantes a respeito do fármaco são encontradas de maneira teórica, sendo elas, log P entre 0,92 e 1,32 e o pKa em torno de 13,68 que se caracteriza como um ácido fraco (Rugbank, 2020).

2.1.3.2 Tratamentos e efeitos colaterais

A molécula do BZN é composta por um grupo nitro e um imidazol, principais responsáveis pelo mecanismo de combate ao parasita no organismo. De maneira antagônica estes mesmos grupos provocam e desencadeiam uma diversa gama de efeitos colaterais nos pacientes em tratamento. Estudos apontam que o mecanismo de ação do BNZ e análogos ocorre a partir da biorredução do grupo nitro, tanto por via aeróbica quanto por anaeróbica. A formação de radicais livres leva a desestabilização celular, potencializando a permeabilidade do composto. Em paralelo ocorre o aumento no estresse oxidativo das células, devido a elevada concentração de radicais livres. A formação dos radicais livre é essencial no combate dos parasitas, mas em contrapartida são extremamente nocivos ao paciente infectado (Palace-Berl, 2012).

Sperandio da Silva *et al.*, (2017) realizou um estudo com 2075 pacientes por 60 dias com doses de 5 a 7,5 mg/kg/dia, com o objetivo de estudar e entender a descontinuidade no tratamento da doença de chagas com BNZ e constatou-se que 89,8% dos pacientes completaram o tratamento e destes, 56,1%, apresentaram reações adversas.

O estudo também concluiu que mulheres que já apresentavam problemas de pele, leves ou moderados, têm 18,6% e 59,0% de chances de interromper o tratamento, respectivamente. Gontijo et al., (2020) mostrou que 37% dos pacientes descontinuaram o tratamento, sendo que destes, 81,8 % relataram que a motivação foi devido aos problemas dermatológicos. Outros estudos também mencionam que para adultos do sexo feminino, problemas dermatológicos são os principais fatores para a desistência do tratamento (Coronel *et al.*, 2017; Gontijo *et al.*, 2020; Olivera *et al.*, 2017; Sperandio da Silva *et al.*, 2017; Viotti *et al.*, 2009).

De maneira similar, Olivera et al., (2017) aponta em estudo que dos 224 pacientes, 76,8% completaram o tratamento, 91,5% apresentaram Reações Adversas (RADs) e 23,2% interromperam o tratamento. Dentre as RADs foram elencadas erupções cutâneas (37,9%), coceira (33,7%), dor epigástrica (26,4%), inchaço abdominal (24,2%) e náuseas (22,1%). As RADs mais apontadas são a incidência de problemas dermatológicos, gastrointestinais, psicológicos, músculo esqueléticos e outros. Diversos estudos mencionam um grande número de reações adversas causadas pelo uso do BNZ, reforçando a importância de estudos e inovações frente a formulações farmacêuticas que reduzem os efeitos colaterais durante o tratamento da DC.

Segundo Álvarez-Hernández et al., (2018) o tratamento é de 60 dias com doses que variam de 5 mg/kg/dia para neonatos, 10 mg/kg/dia para crianças e de 5 a 7 mg/kg/dia para adultos. Os efeitos colaterais mais reportados são dermatológicos (29 a 50 %) durante as duas primeiras semanas de tratamento. A neuropatia periférica é um efeito dependente da dosagem e pode ocorrer durante o tratamento, sendo um indício de suspensão do tratamento (0 a 30%). Outros efeitos importantes são anorexia e perda de peso (5 a 40 %) e parestesia (0 a 30 %).

2.1.4 Novas alternativas de tratamento

Como observado, são diversas as reações adversas causadas pelo tratamento da DC utilizando BNZ, empecilhos que são encontrados também no tratamento com NFX, sendo estes os dois principais fármacos utilizados para o tratamento antiparasitário (Olivera *et al.*, 2017). Diversos outros estudos têm sido realizados na tentativa de sintetizar novas moléculas capazes de eliminar o parasita do organismo infectado, baseadas em novas estruturas contendo grupos nitro ou imidazol, já que os mesmos são

os responsáveis pela biorredução e formação de radicais livres (Paucar; Moreno-Viguri; Pérez-Silanes, 2016a). Paucar; Moreno-Viguri; Pérez-Silanes, (2016a) relatam o BNZ como o fármaco mais indicado no tratamento da DC, seguido pelo NFX que apresenta características similares no quesito eficiência no tratamento e ocorrência de RADs, já novos fármacos como posaconazol, ravuconazol e fexinidazol, apresentaram redução em RADs, mas em contrapartida são inferiores em eficiência na eliminação do protozoário. (Paucar; Moreno-Viguri; Pérez-Silanes, 2016b)

A descoberta de um novo fármaco para o tratamento da DC, que apresente redução significativa dos efeitos colaterais, possibilite eliminar por completo o protozoário em organismos infectados e seja acessível a população de baixa renda, seria o ideal. Porém é de conhecimento da sociedade científica e da indústria farmacológica que a comercialização de um novo fármaco é um processo lento e árduo. Logo, tratando-se de uma doença que é negligenciada e do desinteresse em investimentos no setor, a alternativa mais viável é buscar soluções utilizando os fármacos já certificados.

Na literatura são encontradas diversas propostas com diferentes estratégias para o aumento da eficiência no tratamento e na redução dos efeitos colaterais utilizando o BNZ como base (Ferraz *et al.*, 2018). Uma das principais estratégias para diversificar a aplicação do BNZ é encontrar formas de aumentar sua solubilidade em água. Aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis no mercado e 90% dos fármacos inovadores apresentam limitações em termos de solubilidade aquosa. Como consequência, são encontradas baixa permeabilidade ao intestino/biodisponibilidade e flutuações de absorção (Bhowmik *et al.*, 2013; Sharma; Sharma; Jain, 2016). Amaral *et al.*, (2020) descreveu o potencial do uso de monoterpenos como excipientes para promover o aumento na solubilidade e permeabilidade do BNZ. Santos Souza *et al.*, (2017) relata o preparo de uma solução alcoólica contendo PEG 400 e PPG onde foi possível aplicar uma dose de 40 mg/kg/dia. Lamas *et al.*, (2006) utilizando PEG 400, etil álcool e/ou tampão biftalato de potássio, obteve uma formulação final com solubilidade de 10 mg/mL. Arrúa *et al.*, (2019) em seu recente artigo, descreve os principais nanocarreadores para os fármacos BNZ e NFX. São citadas diversas técnicas e estratégias para tal feito, como: nanopartículas de BNZ e NFX, nanocristais de BNZ na forma de suspensão, nanovesículas lipídicas com BNZ, nanoestruturas lipídicas sólidas de BNZ e BNZ encapsulado em ciclodextrina. O autor cita o uso da nanotecnologia combinada ao

fármaco como a alternativa mais promissora na produção de novas formulações para o tratamento da DC.

Estudos apontam que a utilização da nanotecnologia na confecção de novas formulações contendo fármaco, promove liberação controlada, possibilita vias alternativas de administração, diminuição das doses e efeitos colaterais, entre outros (Vinuesa *et al.*, 2017a). Sistemas alternativos de liberação podem ser confeccionados através da utilização de técnicas de encapsulação para formação de lipídios sólidos, lipossomas, vesículas, nano e microemulsões, entre outros (Streck *et al.*, 2014). Porém técnicas de preparo de formulações nanotecnológicas podem gerar um alto valor agregado ao produto final, tornando inviável a sua utilização. Tratando-se da DC que se enquadra na classe das doenças negligenciadas, é fundamental que as novas formulações sejam passíveis de produção e distribuição para a população.

Outra estratégia é encontrar novas formas de aplicação para BNZ, fazendo uso por exemplo de formulações envolvendo a utilização de ciclodextrinas (de Melo *et al.*, 2016a; Ferraz *et al.*, 2018; Leonardi; Bombardiere; Salomon, 2013; Lyra *et al.*, 2012; Ndayishimiye *et al.*, 2022; Raphael *et al.*, 2018; Soares Sobrinho *et al.*, 2011; Vinuesa *et al.*, 2017a), dispersões utilizando lipídios (Lima, 2012), surfactantes e cosurfactantes (Streck *et al.*, 2014), soluções nanotecnológicas (Vinuesa *et al.*, 2017b), microencapsulação (Barrera *et al.*, 2020), filmes poliméricos (Amaral *et al.*, 2021a), novos excipientes (Santos *et al.*, 2015), mistura eutética (Bezerra *et al.*, 2017) e polimorfos (Honorato *et al.*, 2014; Maximiano *et al.*, 2011a).

No decorrer deste estudo serão abordadas estratégias que visam o aumento da solubilidade e permeabilidade do BNZ e uma forma alternativa para administração, sendo elas: uso de novos excipientes lipídicos e a formulação de um filme polimérico mucoadesivo para liberação transmucosal.

2.1.5 Excipientes

Por definição os excipientes são substâncias que não tem função terapêutica, porém possuem função de solubilização, suspensão, espessante, emulsificante, estabilizante coloração, flavorizante entre outras características (Balbani; Stelzer; Montovani, 2006). Os excipientes são materiais heterogêneos, classificados pela origem: animal (gelatina e lactose), vegetal (celulose e açúcares) e sintéticos (polietilenoglicol,

polisorbatos e pirrolidonas). É importante que as moléculas selecionadas para uma formulação não tragam toxicidade, não aumentem os efeitos adversos e nem reduzam a capacidade de tratamento do fármaco. A utilização de excipientes em formulações farmacêuticas pode trazer melhoria nas propriedades biofarmacêuticas, aumento da estabilidade, melhoria na solubilidade e permeação, e não menos importante, melhoram as características organolépticas. O uso de bons excipientes pode trazer uma maior aceitação pelo público, uma maior adesão aos tratamentos e melhorias no desempenho da formulação (Balbani; Stelzer; Montovani, 2006; Fraga; Freitas, 2015; Silva et al., 2016).

Em recente revisão, Nakmode et al., (2022) discorrem a respeito de excipientes lipídicos, os categorizando em triglicerídeos, glicerídeos mistos e óleos polares, surfactantes solúveis e insolúveis em água, co-solventes como etanol, propilenoglicol, glicerol e polietilenoglicol-400 (PEG-400) e outros aditivos. A 16 anos, Chen, (2008) já mostrava preocupação em torno das regulamentações de lipídios como excipiente e formulações farmacêuticas para sistemas de liberação controlada. Derivados de glicerol, por exemplo, têm sido amplamente utilizados em formulações orais, como nanoemulsões (Streck *et al.*, 2014), emulsões, nanopartículas lipídicas sólidas (Geszke-Moritz; Moritz, 2016), formulações semisólidas, dispersões sólidas (Nambiar *et al.*, 2022), entre diversas outras funcionalidades.

Derivados de glicerol também podem contribuir diminuindo fenômenos de precipitação no trato gastrointestinal, fornecendo uma distribuição uniforme de medicamentos hidrofóbicos (Psimadas *et al.*, 2012; Sarkari *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2015). Sua natureza anfifílica explica a capacidade de emulsionar fármacos (Talele; Sahu; Mishra, 2018). Outra razão para incluir monoglicerídeos em formulações orais é o efeito no efluxo intestinal mediado por P-glicoproteína. Esses excipientes desempenham um papel como inibidores do efluxo, facilitando a absorção de medicamentos (Maximiano; Costa; Souza, 2010).

A busca por novos excipientes e novas combinações excipiente-BNZ já foi descrita por outros autores (Alves-Silva *et al.*, 2014; Ferraz *et al.*, 2018; Maximiano *et al.*, 2011b; Santos *et al.*, 2015) e a preparação de formulações utilizando monoglicerídeos como excipiente é uma das estratégias propostas para o aumento da solubilidade neste estudo. Apesar do amplo uso desses monoglicerídeos em formulações farmacêuticas, a literatura carece de uma compreensão profunda dos mecanismos de interação excipiente

de drogas. Até onde sabemos, nenhum relato de como esses monoglicerídeos interagem com medicamentos são encontrados.

Nos últimos anos, houve esforços de pesquisa com o objetivo de melhorar a solubilidade aquosa e a biodisponibilidade oral deste medicamento. (Lima *et al.*, 2012) por exemplo, prepararam dispersões sólidas de BNZ utilizando dois polímeros hidrofílicos: polietileno glicol 6000 (PEG-6000) e polivinilpirrolidona K-30 (PVP-K-30). Os estudos de modelagem molecular indicaram interações químicas (ligações de hidrogênio) entre BNZ e os polímeros, explicando o aumento da solubilidade do medicamento. A interação entre BNZ e PVP-K-30 mostrou-se três vezes mais estável, pois envolve a ligação C = O (Lima, 2012). Palmeiro-Roldán *et al.*, (2014a), por sua vez, prepararam dispersões sólidas com hidroxipropilcelulose baixa substituição (L-HPC) e desoxicolato de sódio (NADC). BNZ: L-HPC (1:3 m/m) melhorou significativamente a dissolução do BNZ, resultando em uma liberação rápida deste composto (85% em 5 min). Para a combinação BNZ: NADC (1:3 m/m), apenas 24% do medicamento foi liberado em 30 min, demonstrando um perfil de liberação sustentado. Streck *et al.*, (2014) prepararam emulsões O/W onde a fase oleosa foi de óleo de soja, com polissorbatos 80 e monooleato de sorbitano como surfactantes e álcool benzílico, etanol e 2-metilpirrolidona como co-solventes, através do método de inversão de fase. O estudo apontou uma baixa solubilidade do BNZ em óleo de soja, que aumentou quando os surfactantes foram adicionados à preparação.

A inibição da cristalinidade do medicamento também pode contribuir para melhorar a solubilidade e a absorção (Ndayishimiye *et al.*, 2022; Schram; Beaudoin; Taylor, 2015). Em um estudo realizado por nossa equipe de pesquisa, a BNZ foi imobilizada em uma matriz sólida contendo propileno glicol, álcool polivinílico e timol para liberação bucal. A maior permeabilidade do medicamento através da mucosa bucal foi alcançada quando a recristalização do BNZ na interface formulação:solução foi inibida (Amaral *et al.*, 2021a). Portanto, entender como as condições de seleção e processamento dos excipientes afetam a cristalinidade do medicamento é de grande interesse durante a etapa do desenvolvimento de novas formulações.

2.1.6 Monoglicerídeos

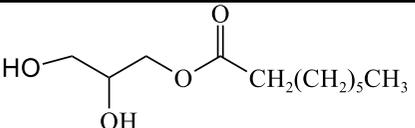
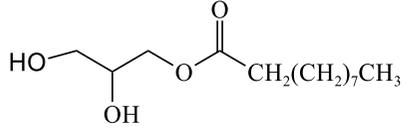
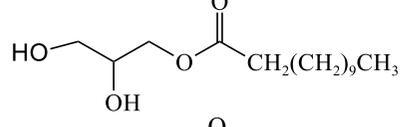
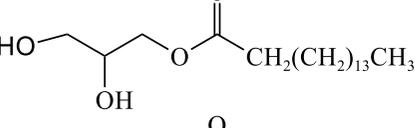
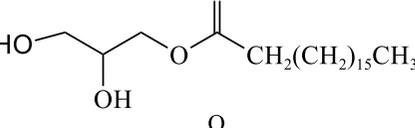
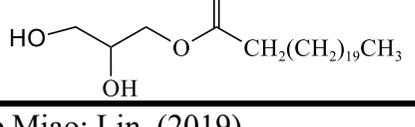
Os monoglicerídeos (MGs) também conhecidos por monogliceróis, apresentam como estrutura básica monoésteres obtidos através da síntese de glicerol com ácidos graxos ou óleos, representando uma série de surfactantes não iônicos (Chen, 2015). Os derivados de MGs e diglicerídeos representam 70% da produção total de emulsificantes no mundo, utilizados na formulação de alimentos, detergentes, plásticos, cosméticos e fármacos (Miao; Lin, 2019). São encontrados diversos tipos de MGs e estes apresentam importantes propriedades, tais como atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral, emulsificante, autoassociação em solução, promotores de solubilidade e permeabilidade, excipientes e outros (Miao; Lin, 2019).

A obtenção de MGs pode ocorrer através da interesterificação de triglicerídeos com glicerol, utilizando catálise básica e elevadas temperaturas (200 – 250 °C), resultando em uma mistura de mono, di e triglicerídeos e glicerol não reagido. Para um maior controle da proporção de produto formado é usualmente utilizada a síntese entre glicerol e o ácido graxo desejado, através de uma esterificação a elevada temperatura e catálise básica (Miao; Lin, 2019). A utilização de catalisadores na síntese é variada, de maneira geral os catalisadores homogêneos (H_2SO_4 , H_3PO_4 , NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$) são vantajosos em relação ao tempo de reação (2-3h). Porém apresentam diversas desvantagens, tais como, elevada energia requerida no processo, baixa seletividade na produção de MGs e dificuldade na recuperação do catalisador, ocasionando assim, na formação de produtos com coloração, odor e gosto indesejado (Kuhrt; Welch; Kovarik, 1950; Siri-nguan; Ngamcharussrivichai, 2016).

Já a utilização de catalisadores heterogêneos, tais como, ácido heteropólio do tipo *keggin*, ácido silicotungstico e óxidos metálicos (MgO e ZnO), impregnados em carvão ativado, dióxido de silício, argila, titânio e zeólitas, apresentam maior seletividade, menor contaminação ambiental, facilidade na recuperação do catalisador e baixo custo de purificação (Yu *et al.*, 2013). Uma terceira alternativa para a síntese de MGs é a catálise enzimática utilizando 1,3-lipase. Em comparação às rotas reacionais citadas, a síntese enzimática necessita de condições reacionais moderadas, alta produtividade, baixo consumo de energia, maior pureza e elevada seletividade em relação a posição. Em contrapartida a rota sintética é vagarosa, complexa, apresenta dificuldade na etapa de purificação e possui limitação frente ao tamanho dos ácidos graxos (Miao; Lin, 2019).

A Tabela 1 apresenta uma lista de MGs com a nomenclatura, número de carbonos da cadeia hidrofóbica, grau de saturação, aparência física, ponto de fusão e propriedades hidrofílicas.

Tabela 1 - Exemplos de MGs e algumas de suas propriedades físicas.

Nome (MGs)	Estrutura	Grau de saturação	Aparência física	Ponto de fusão (°C)	Propriedades hidrofílicas
Monocaprilato		Saturado	Líquido viscoso	40 – 42	Ligeiramente solúvel em água e solúvel em etanol
Monocaprico		Saturado	Sólido gorduroso	48 – 55	Insolúvel em água e solúvel em etanol
Monolaurato		Saturado	Sólido gorduroso	52 – 62	Insolúvel em água e solúvel em etanol
Monopalmitato		Saturado	Sólido gorduroso	65 – 68	Insolúvel em água e solúvel em etanol
Monoestearato		Saturado	Sólido seboso	62 – 64	Insolúvel em água e solúvel em etanol
Monobehenato		Saturado	Sólido seboso	65 – 77	Insolúvel em água e etanol

Fonte: Adaptado de Miao; Lin, (2019).

2.1.6.1 Glicerol monolaurato (GML)

O GML ou 2,3-hidroxipropil dodecanoato é um monoéster de fórmula estrutural $C_{15}H_{30}O_4$, com cauda hidrofóbica de 12 carbonos encontrado de forma natural no leite materno e óleo de coco (50% de GML) (Tabela 1) (National Center for Biotechnology Information, 2021). A obtenção ocorre através da síntese entre o glicerol e o ácido graxo de cadeia média (ácido láurico). O GML sendo um produto aprovado na *Food and Drug Administration* (FDA), é amplamente utilizado como conservante e emulsificante pela indústria de alimentos e cosmética (Lopes *et al.*, 2019b). Outra característica importante é a sua atividade em membranas lipídicas, o que leva a um aumento na permeabilidade (Whaley *et al.*, 2010).

Diversos estudos são reportados na literatura frente ao seu vasto potencial contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e vírus (Lieberman; Enig; Preuss, 2006; Sadiq *et al.*, 2016; Schlievert *et al.*, 2019; Zhang; Sandouk; Houtman, 2016). Zhang *et al.*, (2020) reportam a eficiência de nanofibras de glúten incorporadas com GML para atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureas* e *Escherichia coli*. O estudo também observou o aumento da hidrofobicidade do material juntamente com o incremento de GML à fibra, gerando alto potencial de aplicação do material como embalagem.

Luo *et al.*, (2014) mostram o potencial do GML contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* e *Penicillium glaucum*, onde a concentração inibitória mínima (MIC) foi de 0,32, 0,32 e 0,16 mg mL⁻¹ e a concentração bacteriana mínima (MBC) foi de 1,25, 2,50 e 0,63 mg mL⁻¹, respectivamente. Diversos outros estudos apontam seu potencial parara *Candida albicans* (Seleem *et al.*, 2016) e *Giardia lamblia* (Lopes, Leonardo Q. S. *et al.*, 2016), potencial viral contra HIV, *herpes simples-1*, sarampo e outros mais(Lieberman *et al.*, 2006), potencial anti-inflamatório na região da mucosa vaginal (Schlievert *et al.*, 2019). Lieberman *et al.*, (2006) aponta que o elevado potencial bactericida e viral é advindo da capacidade que o GML tem em solubilizar lipídios e fosfolipídios, promovendo a desestabilização da membrana de proteção de diversos patógenos.

Neste sentido encontra-se o potencial na combinação entre GML e BNZ em uma formulação farmacológica com intuito na liberação do ativo via mucosa bucal. Estudos já foram conduzidos em torno da confecção de nanopartículas, emulsões, lipídios sólidos,

dispersões, entre outros, de GML na encapsulação de princípios ativos voltados para potencializar efeitos bactericidas (Sadiq *et al.*, 2016) e fúngicos de diversos tratamentos. Sadiq *et al.*, (2016) prepararam nanopartículas de GML carregadas com nisin com aproximadamente $59,19 \pm 8,66$ nm de tamanho e um potencial zeta em torno de $-45,1 \pm 2,12$ mV, para o combate ao microrganismo *S. áureas*. Diversos estudos apontam que a utilização do GML em/como sistemas nanoestruturados apresentam grande potencial antimicrobiano, são atóxicos e permitem uma vasta aplicação devido aumento da solubilidade (Lopes, Leonardo Q. S. *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2019a, 2019b; Lopes, Leonardo Quintana Soares *et al.*, 2016). Li *et al.*, (2009) mencionam que o GML protegeu a mucosa vaginal de macacos contra inflamação aguda causada pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV), mesmo sob repetidas aplicações com elevadas dosagens. *In vitro* observou-se a resposta anti-inflamatória de HIV-1 e SIV.

O estudo de Whaley *et al.*, (2010) aponta que é necessário precaução na utilização de GML em concentrações maiores em 5% e em sistemas onde o mesmo não apresenta elevada solubilidade, pois tem-se o risco de toxicidade.

A partir das características e estudos supramencionados, o GML mostra um grande interesse em ser estudado como excipiente para incrementar tanto na solubilização do BNZ quanto na sua permeabilidade na mucosa bucal e auxiliar no processo de incorporação em diferentes formas farmacêuticas.

2.1.6.2 Glicerol monoestearato (GMS)

O GMS ou 2,3-dihidroxiopropil octadecanoato (Tabela 1) é uma molécula anfifílica amplamente utilizada como emulsificante, espessante, antiaglomerante e conservante na indústria de alimentos e bebidas (Chidi; Adebayo, 2018). Encontra-se também em produtos farmacêuticos e cosméticos, devido seu potencial de auto-agregação em sistemas O/W ou em encapsulação de fármacos hidrofóbicos.

Xia *et al.*, (2014) utilizou GMS para a encapsulação de fenofibrato, com intuito de avaliar o efeito do polimorfismo do GMS na incorporação e liberação do fármaco. Observou-se então uma maior taxa de liberação quando ocorre a passagem do estado de cristalino α das nanopartículas para o estado cristalino β . Este efeito é justificado pela maior organização das moléculas de GMS na forma β do que na forma α , promovendo assim, a expulsão do fármaco do sistema. As diferentes formas cristalinas do GMS são

obtidas mediante características distintas de processamento e a forma β , a mais estável, é obtida no decorrer do tempo pela estabilização e reorganização do sistema. O comportamento de polimorfismo do GMS já é bem reportado pela literatura. (Lutton E. S., 1950)

No processo de cristalização são encontrados cristais empacotados na forma hexagonal α na redução de temperatura abaixo de 75 °C, podendo formar duas fases sub- α reversíveis nas temperaturas de 50 e 30 °C. As fases α são termodinamicamente instáveis e são gradualmente transformadas na fase β , onde devido a sua maior organização apresenta uma temperatura de fusão de 85 °C. (Gardouh, 2013; Wang; Marangoni, 2014; Wang; Peyronel; Marangoni, 2016a)

Neste sentido são reportados diversos estudos no intuito de descrever técnicas adequadas para a obtenção das diferentes fases cristalinas de sistemas com GMS. (Wang; Peyronel; Marangoni, 2016b) reporta que a adição de estearoil lactato de sódio (SSL) promove a redução da temperatura de transição da fase α e da temperatura de fusão do GMS. Em sistemas não aquoso a mistura é miscível acima da proporção de 80% de GMS ou SSL. A adição de SSL acima de 20% levou a uma redução do polimorfismo da fase α para a fase β .

Wang; Marangoni, (2015a) realizaram um estudo com intuito de identificar efeitos intrínsecos (adição e concentração de co-emulsificante) e extrínsecos (taxa de resfriamento e agitação) na estabilização da fase α , relatando resultados satisfatórios no uso de SSL e elevadas concentrações de co-emulsificantes, assim como taxa de resfriamento lento na ausência de agitação. O mesmo estudo também menciona que lecitina de soja, mono e diésteres de ácido diacetil tartárico e ácido esteárico neutralizado são utilizados como co-emulsificantes em formulações de bases com MG.

Moran-valero; Ruiz-henestrosa; Pilosof, (2017) avaliaram a performance sinérgica da mistura entre lecitina e GMS em emulsões O/W, onde observou-se a formação de um importante sistema para encapsulação de fármacos com elevada biocompatibilidade.

Dentre todas as características citadas, o GMS apresenta grande potencial no uso como excipiente para o BNZ, visto que a formulação comercial do mesmo, utiliza estearato de magnésio.

2.1.7 Métodos de preparos de formulações sólidas

O preparo de formulações farmacêuticas em pó requer a utilização de métodos adequados para garantir a homogeneidade dos ingredientes. A escolha do método de mistura depende das características específicas de cada formulação e de cada ativo utilizado no processo (Nakmode *et al.*, 2022). Os métodos mais comuns são a mistura por agitação vigorosa em agitadores e homogeneizadores, extrusão a úmido quando é objetivado a produção de grânulos, maceração, moinho de bolas, fusão e *tumbling* (rolagem)(Enose *et al.*, 2014; Jaspert *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2018; Spahn; Zhang; Smyth, 2022).

No processo de maceração, utilizando grau e pistilo, os componentes são combinados no recipiente e em seguida pode ou não ser adicionado um solvente volátil. Essa técnica é especialmente valiosa quando é necessário compatibilizar ingredientes com diferentes solubilidades. A homogeneização de um pó utilizando um moinho de bolas é amplamente empregada na indústria farmacêutica quando os ingredientes são sólidos. Nesse processo, os componentes ativos e excipientes são colocados em um recipiente junto com esferas de moagem, que são agitadas e colidem contra os ingredientes, promovendo a redução do tamanho das partículas e uma mistura eficaz. Esse método é particularmente útil quando se busca a uniformidade de dose em formulações sólidas, como comprimidos e cápsulas, pois permite a distribuição precisa dos ingredientes ativos. O moinho de bolas proporciona um alto grau de controle sobre o tamanho das partículas, o que é essencial para atender aos requisitos específicos, garantindo formulações farmacológicas de alta qualidade, garantindo que os pacientes recebam doses precisas e eficazes de seus medicamentos (Lenschow *et al.*, 2022; Saharan *et al.*, 2008).

O processo de fusão envolve o aquecimento controlado dos ingredientes sólidos até a fusão e homogeneização de ambos, permitindo a completa mistura antes da solidificação. Essa abordagem é especialmente aplicada em formulações que incluem ingredientes lipossolúveis, como ceras e óleos, que podem acarretar em misturas pobres nos métodos supracitados. A fusão permite a dispersão uniforme desses ingredientes em toda a formulação, resultando em produtos finais com consistência e estabilidade desejadas. No entanto, é fundamental controlar a temperatura e o tempo de fusão para evitar a degradação de substâncias termossensíveis e garantir que a formulação mantenha suas propriedades farmacológicas. A técnica de fusão também é empregada para produzir

formulações supositórias e alguns tipos de pomadas, nas quais a mistura é derretida e moldada em uma forma sólida adequada para administração. A técnica de fusão é, portanto, uma abordagem versátil que desempenha um papel fundamental na produção de formulações farmacológicas, garantindo a uniformidade dos ingredientes e a eficácia dos medicamentos (Enose *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

2.1.8 Filmes poliméricos

Polímeros são macromoléculas constituídas por monômeros, obtidos de forma sintética ou natural. São encontrados no mercado diversos tipos de polímeros com variadas funções, dentre estes, os biocompatíveis são utilizados pela indústria farmacêutica como alternativa para aplicação de diversos fármacos. Os polímeros de origem natural, ao contrário dos sintéticos, em sua grande maioria são biocompatíveis e biodegradáveis, facilitando assim sua utilização na confecção de produtos passíveis de serem utilizados em seres vivos (Mansuri *et al.*, 2016). Dentre os polímeros de origem natural podemos citar a quitina, celulose, alginato, pectina, polilisina, proteínas, peptídeos, entre outros. Já de origem sintética os poliacrilatos, polímidas, poli (etileno glicol), poli (vinil álcool), assim como todos os derivados obtidos através da modificação de polímeros naturais como a quitosana e a carboximetilcelulose (Salamat-Miller; Chittchang; Johnston, 2005).

Estes polímeros podem ser mucoadesivos, ou seja, possuem grupos funcionais que interagem com a mucina, principal molécula presente na mucosa. A mucina possui carga predominantemente negativa e diversos grupos livres para a formação de ligação de hidrogênio e interações fracas, logo faz-se necessária a utilização de polímeros com carga positiva e grupos funcionais para formação de ligação de hidrogênio. De maneira geral as características mucoadesivas dos polímeros estão ligadas a grupos com carga positiva e formadores de ligação de hidrogênio, como por exemplos: COOH, OH, NH₂, NH₃⁺ e SH (Laffleur, 2014).

Os filmes poliméricos têm sido amplamente empregados na administração de medicamentos devido à sua capacidade de evitar o metabolismo de primeira passagem e controlar de forma eficaz a liberação de fármacos (Calvo *et al.*, 2019; Nematpour *et al.*, 2020). Esses filmes consistem em membranas finas compostas de uma ou várias camadas de polímeros, podendo ser hidrofílicas ou hidrofóbicas, nas quais os princípios ativos

estão dissolvidos ou dispersos. Quando aderem à mucosa ou à pele, proporcionam a liberação dos medicamentos de forma local ou sistêmica. Além dos polímeros, os filmes podem conter plastificantes, desintegrantes, solubilizantes, estabilizantes e promotores de permeabilidade em sua composição (Notario-Pérez *et al.*, 2019). O processo de mucoadesão de um filme polimérico ou membrana polimérica envolve duas etapas: i) fenômenos de molhagem e intumescimento e ii) interpenetração do polímero na mucosa (Mansuri *et al.*, 2016; Salamat-Miller; Chittchang; Johnston, 2005).

O perfil de liberação dos ativos da matriz polimérica pode ser ajustado conforme as necessidades de tratamento, exigindo a realização de ensaios de liberação ou permeação. A utilização de polímeros mucoadesivos é fundamental para prolongar o tempo de contato das formulações com a mucosa. De modo similar, Amaral *et al.*, (2021) propôs o desenvolvimento de filmes poliméricos de PVAL contendo BNZ e timol para liberação transmucosal, evitando assim a passagem do fármaco pelo sistema digestivo e consequentemente reduzindo os efeitos colaterais causados no sistema gástrico. Os filmes poliméricos podem ser projetados com diferentes tamanhos e espessuras, sendo uma opção de produção econômica e escalonável. Além disso, podem ser facilmente removidos quando necessário e permanecem aderidos na área de aplicação por períodos mais longos, em comparação com formulações semissólidas, como géis e pomadas.

2.1.9 Quitosana

A quitosana é um polímero derivado da quitina [poli($\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetil-D-glicosamina)], que por sua vez é um dos componentes principais dos exoesqueletos de artrópodes, como crustáceos (caranguejo e camarão) e insetos (barata), bem como da parede celular de alguns fungos. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante, seguido da celulose, porém suas aplicações são limitadas, sendo necessário realizar a desacetilação parcial (>50%) a partir de tratamento alcalino ou hidrólise enzimática via quitina desacetilase para obter a quitosana. A representação esquemática da sua estrutura primária (Figura 6) nos mostra que a quitosana é formada pela repetição de unidades betas (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose ou D-glucosamina (Wang *et al.*, 2013).

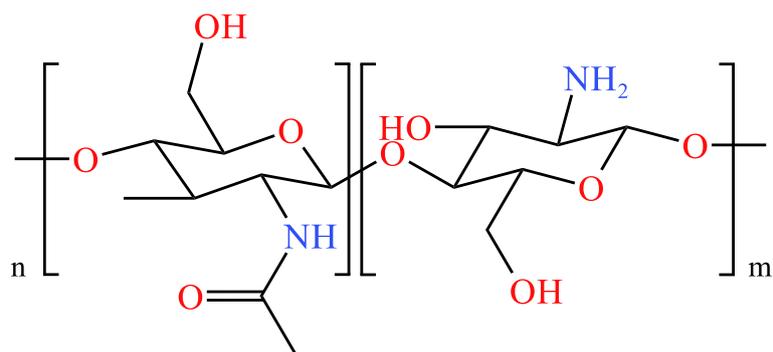


Figura 5. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, na forma acetilada (n) e desacetilada (m). Adaptado de (Wang *et al.*, 2013).

A presença de grupos hidroxila, acetilamida e grupos amina livres, permitem que a quitosana apresente propriedades muito peculiares, como antimicrobianas, biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades físico-químicas que auxiliam na formação de materiais poliméricos de diversas características, como géis, filmes, fibras, esponjas e nanopartículas, com propriedades mucoadesivas. Além disso, por ser um polímero proveniente de fontes naturais e renováveis apresenta baixa toxicidade. O potencial mucoadesivo é devido a protonação do grupo NH₂ em meio ácido (pH < 6,0), formando um polímero catiônico. (Sanches *et al.*, 2020a)

Desse modo, a quitosana favorece o desenvolvimento de algumas áreas científicas (química, física, biomedicina), impulsionando o aprimoramento de métodos voltados a engenharia de tecidos, embalagens inteligentes de alimentos e liberação de fármacos (Borchard; Esmaeili; Heuking, 2012a; Mazzarino; Borsali; Lemos-Senna, 2014a; Real *et al.*, 2018). Outro ponto é a capacidade de absorção em meios aquosos, e sua baixa toxicidade elimina qualquer potencial risco para a epiderme humana, assim como para as mucosas bucais e nasais. Logo, a utilização da quitosana pode representar uma rota viável para liberação de fármacos hidrofóbicos na corrente sanguínea através da mucosa oral.

2.1.10 Método de preparo dos filmes

A preparação de filmes poliméricos contendo fármacos é uma técnica essencial na formulação de sistemas de liberação controlada e filmes mucoadesivos em aplicações farmacêuticas. Um dos métodos mais comuns é a técnica de evaporação de solvente (*casting*), na qual um polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente volátil

compatível e, em seguida, a solução é despejada em um molde e deixada evaporar (Figura 7), resultando em um filme polimérico contendo o fármaco (Notario-Pérez *et al.*, 2019).

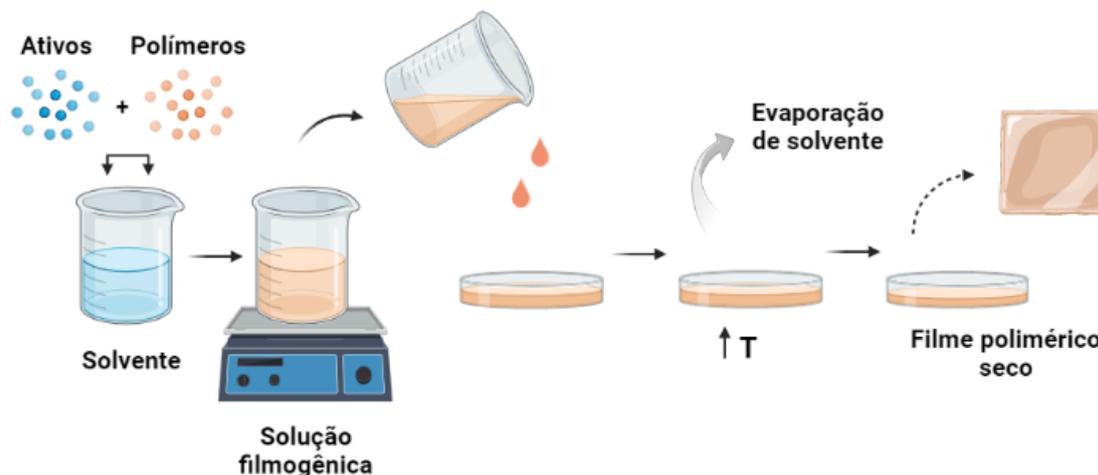


Figura 6. Técnica de evaporação de solvente. Criado a partir de Biorender (2022).

Sempre que possível, deve-se evitar o uso de solventes orgânicos para evitar resíduos nos filmes. A escolha do solvente pode afetar a cristalização de fármacos, um fenômeno que também está relacionado à taxa de evaporação desse solvente (Tian *et al.*, 2019). Outro método é a produção de filmes a partir da extrusão por fusão, que é amplamente utilizada para a fabricação de filmes poliméricos termoplásticos, nos quais o polímero e o fármaco são derretidos e misturados antes de serem moldados em filmes finos (Regev *et al.*, 2019). Ambos os métodos oferecem controle sobre a composição, espessura e propriedades físicas dos filmes, permitindo a entrega controlada e direcionada de fármacos, tornando-os uma ferramenta valiosa na indústria farmacêutica para diversas aplicações, como terapias transdérmicas, bucais, oftálmicas, entre outras.

Outra alternativa amplamente citada na literatura são as técnicas de *eletrospray* e eletrofiação, que consistem na formação de fibras através da aplicação de um campo elétrico e na evaporação de solvente. Porém, embora sejam escalonáveis, essas técnicas demandam um rigoroso controle de parâmetros, como diâmetro do capilar, tensão elétrica, taxa de fluxo e distância até o coletor, a fim de garantir baixas variações entre lotes (Feng *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação entre Benznidazol (BNZ) e os monoglicerídeos (MGs), Glicerol monolaurato (GML) e Glicerol monoestearato (GMS), como proposta para novos excipientes para posterior incorporação em matriz polimérica mucoadesiva de quitosana, visando o tratamento da doença de Chagas através da liberação transbucal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o método mais adequado para a compatibilização das misturas BNZ:GML (BL) e BNZ:GMS (BE) através dos parâmetros de Flory-Huggins;
- Compreender a natureza das interações entre o BNZ e os potenciais novos excipientes GML e GMS através de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR) e Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar a cristalinidade do BNZ nas misturas, através de análises de Microscopia óptica de luz polarizada (PLOM), Microscopia eletrônica de varredura (SEM), Difração de raios-X (DRX), Calorimetria de varredura diferencial (DSC);
- Avaliar a solubilidade das misturas BL e BE em tampão PBS pH 6,8;
- Desenvolver uma metodologia de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação de BNZ após ensaios de permeabilidade;
- Desenvolver uma metodologia de preparo e incorporação de BNZ, BNZ:GML e BNZ:LA em um filme mucoadesivo de quitosana;
- Caracterizar as matrizes poliméricas por análises de DSC, SEM, PLOM, DRX, FTIR, ângulo de contato e mucoadesão;
- Avaliar a permeabilidade de BNZ a partir dos sistemas formados, utilizando célula de Franz em amostras de mucosa bucal suína.

4. CAPÍTULO II

Estudos de compatibilidade de fármaco-excipiente no desenvolvimento de uma formulação farmacológica: um estudo de caso com benznidazol e monoglicerídeos

Resumo

Monoglicerídeos (MGs) como monolaurato de glicerol (GML) e monoestearato de glicerol (GMS), têm sido usados como excipientes em formulações orais devido ao seu efeito emulsificante, bem como a sua capacidade de inibir a precipitação e o efluxo intestinal de medicamentos. Estudos de compatibilidade excipiente-medimento, entretanto, têm sido pouco explorados. Neste estudo, o benznidazol (BNZ) foi selecionado como modelo de medicamento pela dificuldade de melhorar sua solubilidade e pelo potencial impacto na saúde pública (único medicamento utilizado atualmente no tratamento da doença de Chagas). O efeito de diferentes condições de processamento (maceração, moagem de bolas e fusão) nas propriedades físico-químicas de misturas BNZ/MG foi investigado para orientar o desenvolvimento racional de novas formulações sólidas. O GML foi mais eficaz na melhoria da solubilidade do BNZ, o que pode ser devido à sua estrutura mais maleável, natureza menos hidrofóbica e maior interação com o BNZ. As formações de ligações de hidrogênio entre o grupo imidazol do BNZ e a região polar do GML foram confirmadas por análises de espectroscopia (FTIR, ¹H RMN). Quanto maior o teor de monoglicerídeos na mistura, maior será a solubilidade do BNZ. Independentemente do método de processamento da mistura, o medicamento revelou-se cristalino. A análise por microscopia de luz polarizada mostrou a presença de esferulitos. No geral, essas descobertas sugerem que os métodos de preparação de formulações de BNZ:MGs que envolvem tratamento térmico e/ou mecânico têm baixo impacto nas propriedades sólidas do material, e isso permite a produção de formulações com desempenho reprodutível.

Palavras-chave: monoglicerídeos, benznidazol, solubilidade, estudo de compatibilidade.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Materiais

O benznidazol (99% de pureza) (BNZ) foi gentilmente cedido pela LAFEPE (Recife, PE, Brasil). Os monoglicerídeos monolaurato de glicerol (GML) e monoestearato de glicerol (GMS) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e Alfa Aesar (Massachusetts, EUA), respectivamente. Todos os outros produtos químicos e reagentes utilizados eram de grau analítico. Solução salina tamponada com fosfato foi preparada com Na_2HPO_4 10,1 mmol L^{-1} , KH_2PO_4 1,8 mmol L^{-1} , NaCl 136,9 mmol L^{-1} e KCl 2,7 mmol L^{-1} e ajustada para pH 7,4 com HCl 1 mol L^{-1} .

4.1.2 Preparação de misturas fármaco-excipiente por maceração, moinho de bolas e fusão

As diferentes proporções de BNZ+GML (BL) e BNZ+GMS (BE) consideradas neste estudo são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Diferentes proporções de monoglicerídeos e benznidazol consideradas no estudo.

Amostra	Composição		
	BNZ (%)	GML (%)	GMS (%)
BL10	10	90	-
BL30	30	70	-
BL50	50	50	-
BL70	70	30	-
BL90	90	10	-
BE10	10	-	10
BE30	30	-	30
BE50	50	-	50
BE70	70	-	70
BE90	90	-	90

A mistura macerada (Ma) foi preparada em almofariz com auxílio de pistilo. Para isso o componente correspondente a menor quantidade de pó foi diluída com uma quantidade equivalente do outro material na mistura (OBS. 5 minutos de mistura). Em seguida, foi adicionada gradativamente a quantidade equivalente do pó restante até atingir a proporção final. Um moinho de bolas rotacional concêntrico (Retsch PM 200, Alemanha) carregado com bolas cerâmicas foi utilizado para obter uma mistura moída (Mo). O tempo de moagem e a velocidade de rotação foram de 24 horas e 200 rpm, respectivamente. Para a preparação da mistura fundida (Me), os pós foram inicialmente adicionados em placa tipo Kapton® e em seguida fundidos a 80°C. Tanto o fármaco como o excipiente são estáveis a esta temperatura. Após obtenção de uma mistura homogênea, a amostra foi resfriada em condições ambientes.

4.1.3 Caracterização físico-química

4.1.3.1 Análise térmica

As análises termogravimétricas (TG) foram realizadas em um TGA-50 Shimadzu (Kyoto, Japão). Para as análises, 5-10 mg de amostra foram inicialmente colocados em uma panela de platina e aquecidos de 25 a 800 °C (10 °C min⁻¹) sob atmosfera inerte de nitrogênio (50 mL min⁻¹) (Amaral *et al.*, 2021b).

Os termogramas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidos em um calorímetro TA Instruments Q200 (New Castle, EUA) na faixa de temperatura de -5 a 200 °C (taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹) sob atmosfera inerte de nitrogênio (50 mL min⁻¹).

O parâmetro Flory-Huggins χ (fármaco-monoglicerídeo) foi calculado através da seguinte Equação 1:

$$\frac{1}{T_{m^0}} - \frac{1}{T_m} = -\frac{R}{\Delta H} \left[\ln \Phi_{drug} + \left(1 - \frac{1}{m}\right) \Phi_{drug} + \chi_{(drug-MGs)} (\Phi_{(MGs)})^2 \right] \text{ Equação (1)}$$

Onde “ Φ ” é a fração mássica do medicamento; “ T_m ” e “ T_{m^0} ” são os pontos de fusão do fármaco na mistura fármaco/MGs e puro, respectivamente; “ R ” é a constante do gás ideal e “ ΔH ” é a entalpia de fusão do fármaco.

A variável “ m ” é definida pela razão entre o volume do MG e o volume molecular do fármaco, conforme Equação 2:

$$m = \frac{\frac{M_w(MG)}{\rho_{MG}}}{\frac{M_w(drug)}{\rho_{drug}}} \text{Equação (2)}$$

Onde “Mw” é a massa molar e “ρ” é a densidade dos materiais (Tian *et al.*, 2013).

4.1.3.2 Microscopia óptica de luz polarizada (PLOM)

As imagens PLOM foram obtidas utilizando um microscópio óptico Moitec (Vancouver, Canadá) adaptado com estágio quente e filtros polarizados. As amostras foram aquecidas a 190 °C (5°C min⁻¹) e depois resfriadas para avaliação dos processos de recristalização.

4.1.3.3 Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos utilizando um instrumento Bruker modelo D2 Phaser (Karlsruhe, Alemanha) com radiação Kα de cobre (λ = 1,5418 Å) e detector de cintilação unidimensional LynxEye, operando com corrente de 10 mA e tensão de 30 kV. As medições foram realizadas à temperatura ambiente utilizando uma varredura angular de 2θ na faixa de 5 a 40°, com passo angular de 0,091° s⁻¹.

4.1.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram adquiridos num Shimadzu IRPrestige-21 (Kyoto, Japão) após preparação de pastilhas de KBr. As análises foram realizadas na faixa espectral de 4.000–400cm⁻¹, resolução 2cm⁻¹, com um total de 25 aquisições por amostra.

4.1.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As imagens SEM foram tiradas usando um microscópio JEOL JSM - 6701F (JEOL USA, Inc, Peabody, MA, EUA), selecionando uma tensão de aceleração de 8 e 10 kV. O pó foi depositado sobre fita de carbono e recoberto com ouro para as análises.

4.1.3.6 Ressonância Magnética Nuclear ¹H

Após solubilização das amostras em (CD₃)₂CO, os espectros de RMN de ¹H foram registrados em um espectrômetro de RMN Varian de 400 MHz (Varian Inova AS 400, Palo Alto, CA, EUA), nas especificações de 12 varreduras, largura espectral de 20,62 ppm e 65.536 pontos de dados brutos.

4.1.3.7 Estudos de solubilidade aparente

Para os estudos de solubilidade aparente, preparou-se misturas (n=4) de BNZ e/ou BNZ-MGs em 5 mL de solução de PBS (pH 7,4), ambos os ativos foram adicionados em excesso. Os frascos foram então mantidos sob agitação (240 rpm) a 37 °C por 48 horas em incubadora com agitador orbital Novatecnica NT715 (Piracicaba, SP, Brasil) (Amaral *et al.*, 2020). Alíquotas de cada frasco foram filtradas com membranas de 0,45 µm, diluídas em água e analisadas por espectroscopia UV-vis em espectrofotômetro modelo Nova 1800UV a 324 nm (comprimento de onda máximo de absorção do fármaco) (Palmeiro-Roldán *et al.*, 2014b). A seletividade do método foi previamente avaliada e os monoglicerídeos não afetaram a quantificação do BNZ neste número de onda. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 6.0). ANOVA unidirecional seguida pelo teste de *Tukey* foi utilizada para comparações múltiplas.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.4 Caracterização do estado sólido

4.1.4.1 Análise termogravimétrica (TG)

A estabilidade térmica das misturas e seus constituintes foi inicialmente avaliada por análises de TG (Fig. 8a e 8b e Tabela 3). Os termogramas do BNZ mostraram dois eventos principais de perda de massa (a 290 e 323,5 °C, que resultaram em uma perda de massa de 42,8% e 32,2%, respectivamente) e uma massa residual de 24,9% (Amaral *et al.*, 2021a; Soares-Sobrinho *et al.*, 2010). GML e GMS puros foram estáveis até 243,5 e 354 °C, respectivamente; com uma degradação completa após atingir essas temperaturas.

A mistura BL50 apresentou redução na estabilidade térmica do BNZ (290 a 244 °C) e nenhuma alteração para o GML puro. Da mesma forma, foi encontrada uma diminuição na estabilidade térmica tanto para o BNZ (290 a 259 °C) quanto para o GMS (354 a 259 °C) da mistura BE50. Dado que foram observadas alterações significativas na degradação dos componentes após a mistura, foi levantada a hipótese de uma interação medicamento-excipiente.

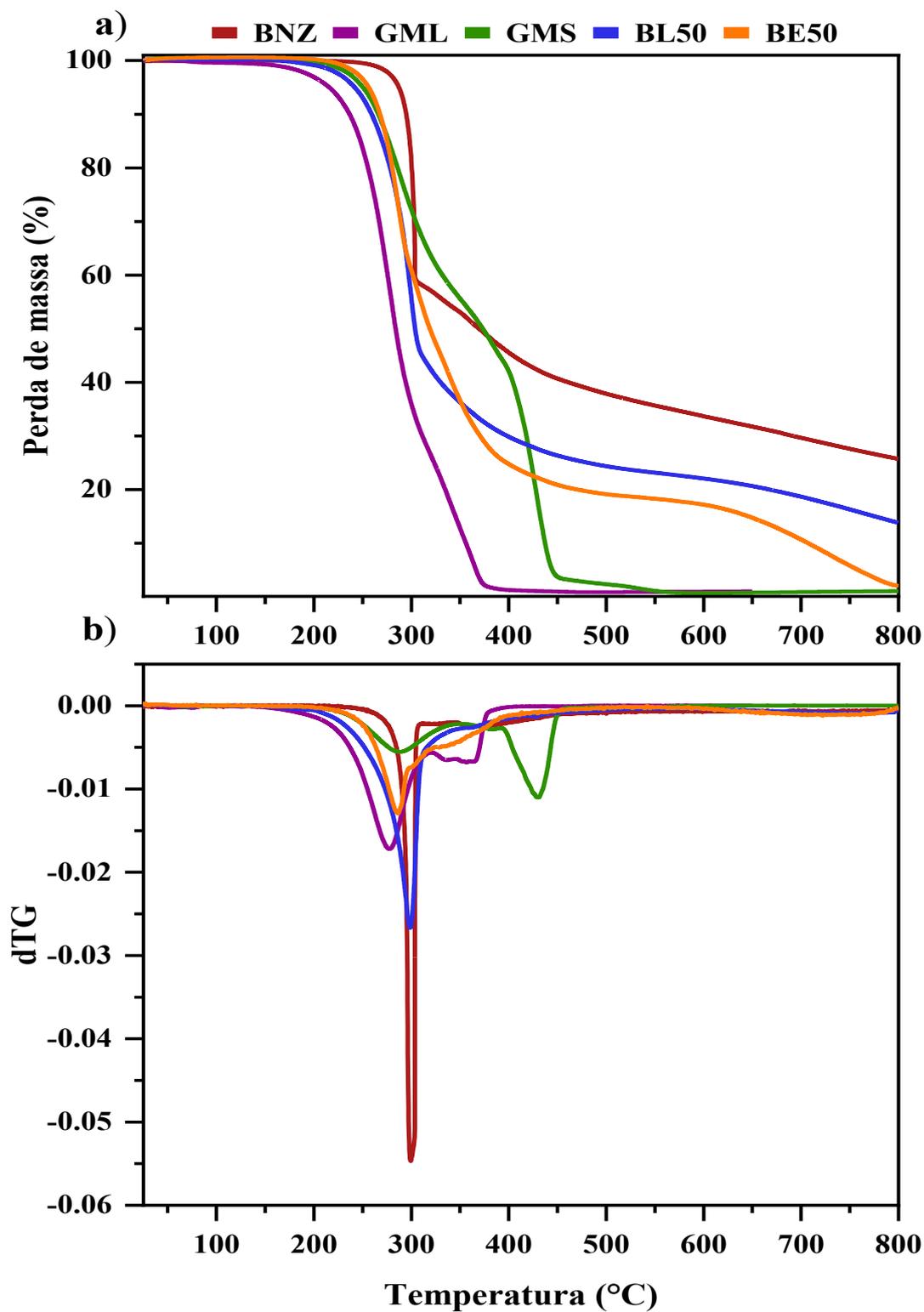


Figura 7. Termogramas (perda de massa versus temperatura (a) e primeira derivada (b)) para BNZ, GML, GMS e BL50 e BE50 macerado.

Tabela 3. Resumo da análise de TG, eventos de perda de peso, temperatura inicial e final e resíduo.

Amostra	Etapa 1		Etapa 2		Resíduos ^c
	T _i - T _f (°C) ^a	PM (%) ^b	T _i - T _f (°C) ^a	PM (%) ^b	
BNZ	290 a 308	42,8	323,5 a 441,3	32,3	24,9
GML	243,5 a 323	99,3			0,7
GMS	354 a 442	97,8	506 a 546	1,5	0,7
BL50	244 a 314	83,2			16,8
BE50	259 a 338	81,8	625,8 a 772	16,4	0,4

^aTemperatura inicial e final do evento de perda de massa (°C)

^bPerda de massa em cada etapa (%)

^cResíduos após 800°C (%)

4.1.4.2 Calorimetria exploratória diferencial

As análises de DSC foram realizadas de 25 a 200 °C, pois nenhum evento de perda de peso foi identificado nesta faixa de temperatura a partir das análises de TG (Tabela 3). Para BL e BE preparados pelo método de maceração (Figura 9a e 9b), a temperatura de fusão do BNZ diminuiu com o aumento da proporção de MGs.

Como foi observada uma redução de temperatura mais significativa para BL, esta mistura foi selecionada para testes adicionais, considerando o moinho de bolas (Figura 9c) e a fusão (Figura 9e) como método de preparação da mistura fármaco-excipientes. As temperaturas de fusão mais baixas foram alcançadas pelo método de fusão, seguido do método de maceração e depois moagem de bolas. A Figura 9f mostra a comparação da entalpia de fusão entre os métodos de preparação e quando foram consideradas diferentes misturas. Não foram encontradas alterações significativas nos termogramas de DSC quando comparadas as diferentes misturas diferentes misturas ou diferentes métodos de preparo, com exceção da amostra BLMo. Este resultado pode ser explicado pela não homogeneidade da mistura (BLMo) durante o seu preparo utilizando o moinho de bolas.

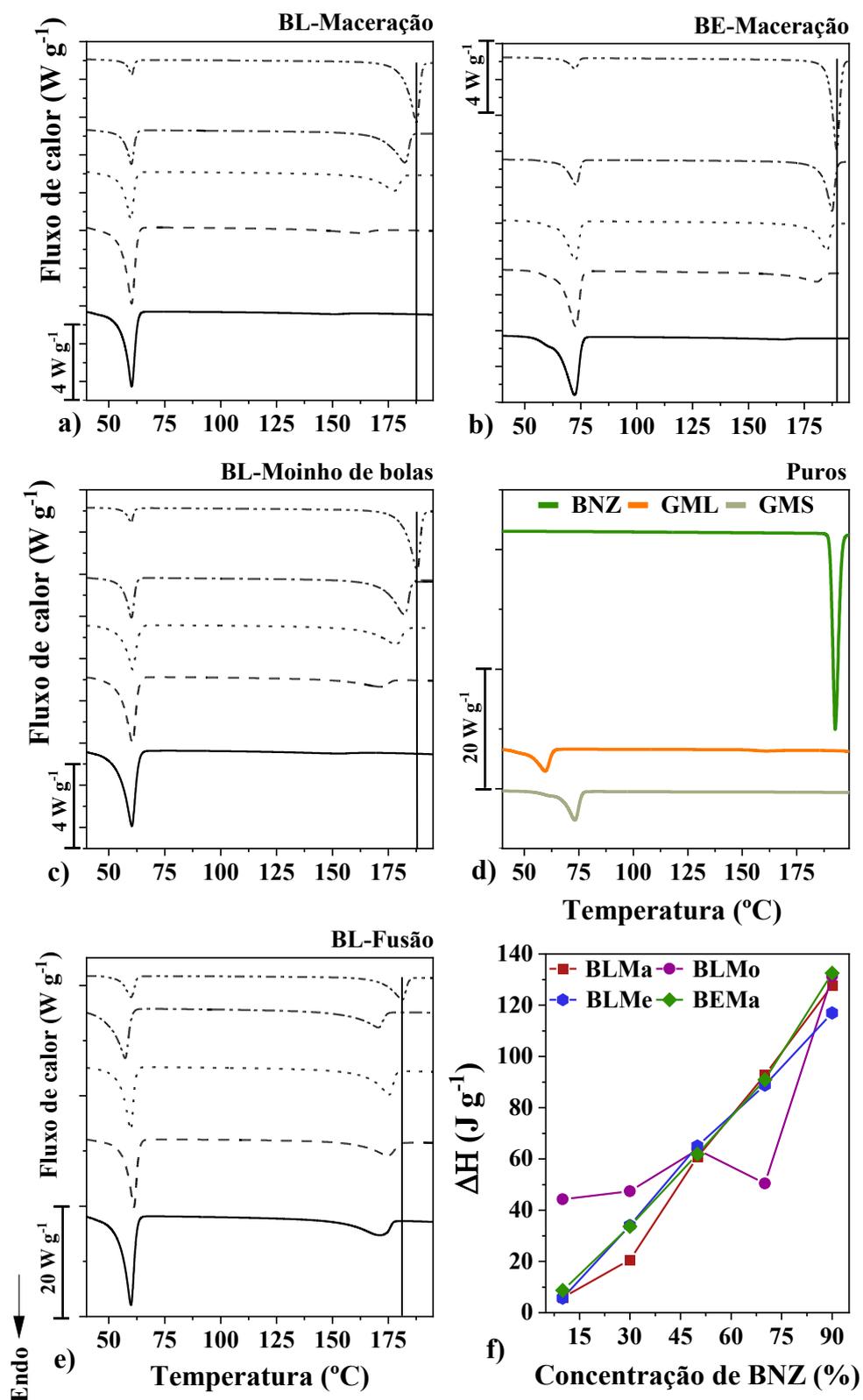


Figura 8. Curvas DSC de BL macerado (a), BE macerado (b), BL processado com moinho de bolas (c), componentes puros (d), BL fundido (e) e um gráfico de concentração de BNZ vs ΔH_{fus} (f). Proporção BNZ/GML: 90/10 (····), 70/30 (-·-·-), 50/50 (---), 30/70 (--) e 10/90 (-). Uma barra foi adicionada aos gráficos à esquerda para facilitar a comparação das diferentes curvas DSC.

O modelo Flory-Huggins (Tabela 4) apresentou bom ajuste dos dados, pois foram obtidos valores de R^2 próximos de 1. Os valores positivos do parâmetro de interação Flory-Huggins sugerem que os constituintes da mistura são “não miscíveis” ou não há solubilização do BNZ nos MGs. Embora aparente uma maior alteração no comportamento térmico do BNZ na presença de GMS, não é diferença estatística entre os valores encontrados. A energia utilizada no processamento da mistura BL pode não ter sido suficiente para a solubilização do fármaco no GML, justificando estes resultados. O processamento de BL por diferentes métodos (maceração, fusão e moagem de bolas) não afetou a miscibilidade desses materiais e, do ponto de vista do modelo Flory-Huggins, eles poderiam ser utilizados de diferentes formas, conforme as necessidades da indústria.

Tabela 4. Resumo do parâmetro Flory-Huggins e ajuste dos dados.

Amostra	Método de preparo	Parâmetro de Flory-Huggins	R^2
BL	Maceração	$2,27 \pm 0,21$	0,9752
	Moinho de bolas	$2,31 \pm 0,21$	0,9765
	Fusão	$2,28 \pm 0,21$	0,9765
BE	Maceração	$2,02 \pm 0,15$	0,9639

^aAs curvas utilizadas para obter os parâmetros de Flory-Huggins estão apresentados em detalhes no anexo 1.

Para uma melhor compreensão do comportamento do fármaco, das misturas e do efeito da adição dos excipientes, foram realizadas análises de capacidade calorífica a pressão constante (C_p) entre as temperaturas de 110 a 200 °C (Figura 10). As curvas mostram que para ambas as amostras, com o incremento da temperatura ocorrem apenas transições de segunda ordem, em específico da natureza ordem-desordem de longo alcance.

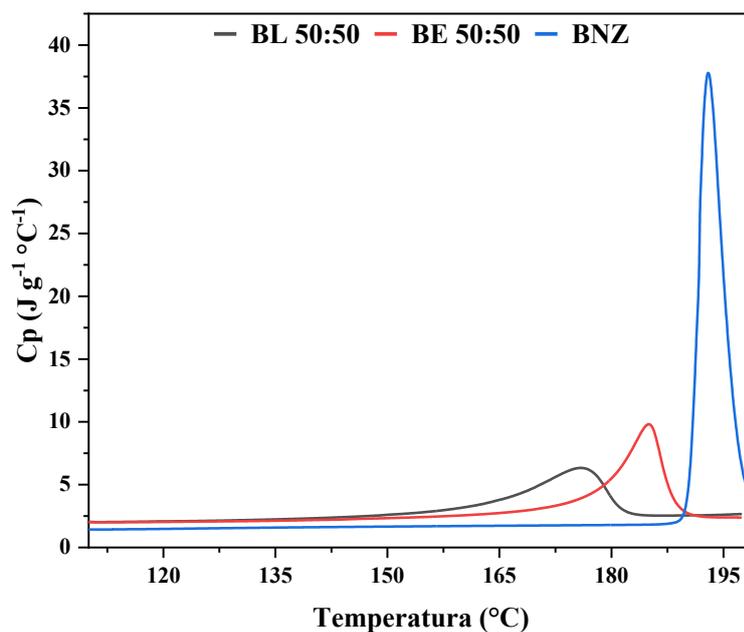


Figura 9. Curvas de capacidade calorífica a pressão constante (C_p) para o BNZ puro as misturas BL 50:50 e BE 50:50 entre as temperaturas 110 e 200 $^\circ C$.

Ambas as misturas apresentaram uma redução significativa da temperatura de transição, sendo a BL 50:50 a mais baixa, mostrando uma maior interação entre o GML e o BNZ. Esta diminuição de temperatura pode estar relacionada a redução da cristalinidade do BNZ, devido a diminuição das interações de hidrogênio intramolecular BNZ-BNZ e um aumento das interações BNZ-GML, aumentando os graus de liberdade das moléculas do fármaco. Imagens de microscopia com luz polarizada cruzada de amostras recristalizadas após resfriamento são apresentadas na Figura 11.

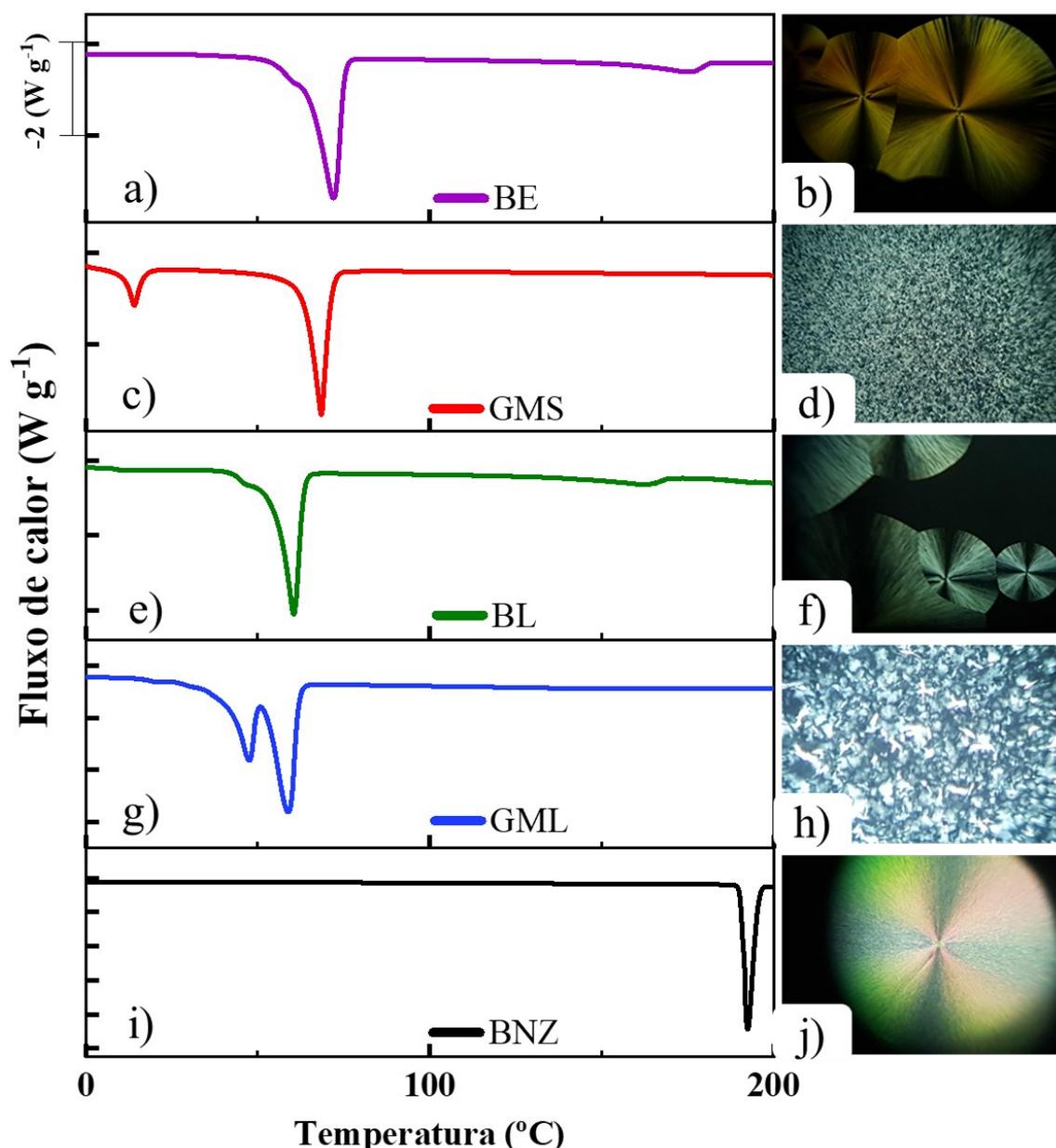


Figura 10. Curvas DSC e imagens de microscopia óptica com polarização cruzada para BE (a, b), GMS (c, d), BL (e, f), GML (g, h) e BNZ (i, j). Fluxo de calor para baixo (endo).

Considerando a presença de dois eventos de fusão nos termogramas dos monoglicerídeos puros, após um resfriamento rápido e duas regiões com coloração contrastante em imagens de microscopia, foram sugeridas duas fases cristalinas distintas (Miao; Lin, 2019). Após mistura com o fármaco, os monoglicerídeos apresentaram alterações no seu comportamento térmico, principalmente no primeiro sinal endotérmico. Nessas mesmas amostras, foi encontrado um segundo evento térmico acima de 150 °C, possivelmente associado à temperatura de fusão do fármaco (Tabela 5). A cristalinidade do BNZ (esferulitos) foi mantido mesmo na presença dos MGs. Por outro lado, também

foram encontrados maior número de esferulitos e aumento da área escura após a mistura do BNZ com monoglicerídeos. O maior número de esferulitos pode estar associado à rápida taxa de resfriamento, como já relatado (Honorato *et al.*, 2014), enquanto o aumento da área escura sugere uma redução no grau de cristalinidade do BNZ como resultado de sua interação com monoglicerídeos. Em um estudo com micropartículas de quitosana-BNZ, também foi encontrada redução na cristalinidade do medicamento devido a interações químicas com o polímero (Haneef; Ali; Chadha, 2021).

Tabela 5. Valores de temperatura e entalpias de fusão das curvas calorimétricas apresentadas nas Figuras 9d e 11.

Amostra	Transições térmicas			
	T ^a	$\Delta_{fus}H^b$	T ^a	$\Delta_{fus}H^b$
GML	52,7	41,2		
GML após recristalização	41,4	-	51	-
GMS	66,3	51,8		
GMS após recristalização	11,7	10,8	62,2	27,9
BNZ	189,7	120,6		
BL50:50	53	34,8	143	-
BE50:50	63	36,5	160	-

^aTemperatura do evento endotérmico (°C)

^bEntalpia de fusão (J g⁻¹)

4.1.4.3 Difração de raios-X (DRX)

O padrão de DRX do BNZ puro apresentou picos em 7,15; 10,6; 16,5; 21,58; 25° (Maximiano *et al.*, 2011a; Palmeiro-Roldán *et al.*, 2014b). Todas as posições de pico correspondem à estrutura cristalina original monoclinica (Maximiano *et al.*, 2011a). Picos de difração característicos dos MGs, por sua vez, foram identificados em 18 e 26° em 2θ (Kuhrt; Welch; Kovarik, 1950; Zhang *et al.*, 2021). Quando difratogramas de misturas MG/BNZ processadas através de diferentes métodos foram comparados (Figura 12b, 12c e 12d), foram encontradas as mesmas reflexões de DRX encontradas nas matérias-primas (BNZ e MGs). Portanto, não foi indicada nenhuma formação de novas fases cristalinas (por exemplo, novos polimorfos, sais ou cocrystalis). Em outro estudo de compatibilidade droga-excipiente relatado na literatura, o mesmo padrão de DRX foi detectado para o BNZ após a recristalização. Os autores concluíram que é improvável que ocorram rearranjos moleculares na rede cristalina (Maximiano *et al.*, 2011a).

A moagem de bolas foi considerada o método mais eficaz para reduzir a cristalinidade do material. A mistura final obtida a partir deste método demonstrou padrões de DRX semelhantes mesmo para diferentes proporções de constituintes. Para os outros dois métodos de processamento (maceração e fusão), a intensidade do pico aumentou proporcionalmente com a quantidade de cada componente. A cinética de cristalização rápida para o BNZ seria observada mesmo quando métodos de alta energia, como moagem de bolas, fossem usados. Este fato também explica a dificuldade de solubilização do fármaco em diferentes meios aquosos.

Outros estudos da literatura utilizaram energia mecânica e/ou térmica para a preparação de formulações e também relataram a presença de BNZ cristalino (Maximiano *et al.*, 2011a; Palmeiro-Roldán *et al.*, 2014b). Barrera *et al.*, (2020) por exemplo, encontraram redução parcial na cristalinidade do fármaco após a preparação de micropartículas de quitosana-BNZ. No método de preparo, após solubilização em meio ácido, foi realizada uma etapa final de secagem a 40°C. Segundo os autores, a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares específicas entre a quitosana e a droga explicaria as mudanças nos padrões cristalinos da droga. Palmeiro-Roldán *et al.*, (2014b) também encontraram fármaco cristalino após a preparação de dispersões sólidas de BNZ, utilizando o método de evaporação do solvente através de um processo de liofilização.

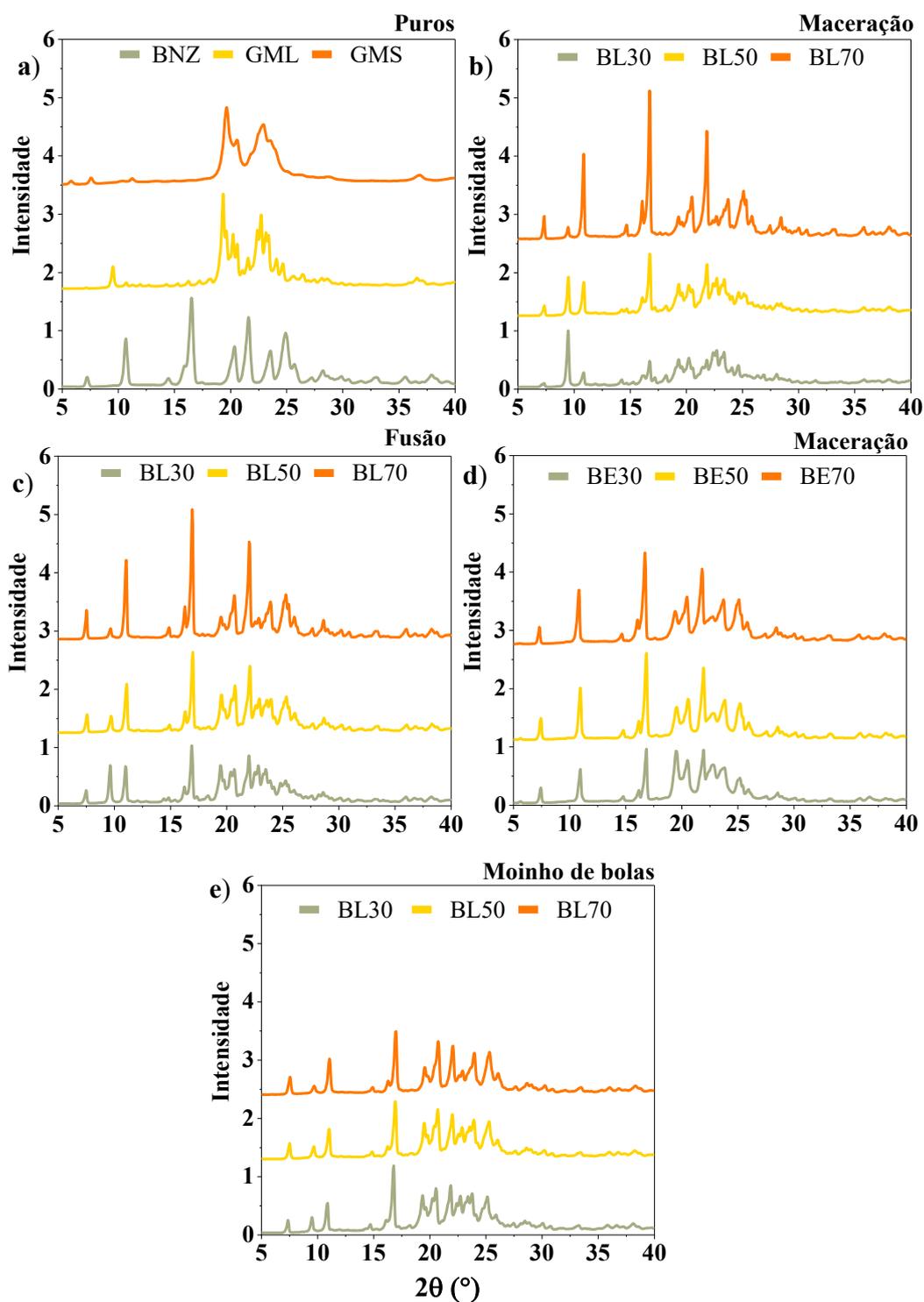


Figura 11. Difratoogramas de BNZ e MGs puros (a), bem como misturas binárias de BNZ/MG considerando diferentes métodos de processamento: BLMa (b), BLMe (c), BEMa (d) e BLMo (e).

4.1.4.4 Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

Para o BNZ (Figura 13a), as bandas de absorção da amida secundária NH aparecem em 3274 cm^{-1} , e a vibração de estiramento da amida carbonila secundária é encontrada em 1660 cm^{-1} . A deformação axial de C-H de grupos aromáticos de drogas é identificada em $3130, 3112, 3067$ e 3032 cm^{-1} . A banda de absorção do N-O aparece na faixa de 1660 a 1500 cm^{-1} . As ligações C-C do anel aromático são observadas em $1500, 1486$ e 1418 cm^{-1} ; anel aromático C-H entre 900 e 675 cm^{-1} e vibração de estiramento em 1364 e 1336 cm^{-1} refere-se a ligação C-N de amins aromáticas (De Melo *et al.*, 2013; Lidani *et al.*, 2019; Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, 2005; Soares-Sobrinho *et al.*, 2010).

Para os monoglicérides, foram obtidos espectros de IR semelhantes. A banda OH pode ser considerada para diferenciar o comportamento espectroscópico dos monoglicérides, que aparece em 3320 e 3421 cm^{-1} para GML e GMS, respectivamente, indicando que as interações intramoleculares são mais intensas para o GMS. A vibração de estiramento C-H é identificada em $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$, a banda éster em 1730 cm^{-1} e a vibração de estiramento C-O entre 1260 e 1000 cm^{-1} (Glavcheva-Laleva *et al.*, 2015; Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, 2005).

Comparando os diferentes métodos de preparação para o sistema BL, foi observado um deslocamento da banda C-N de 1339 para 1336 cm^{-1} em todas as condições de processamento. A formação de uma ligação de hidrogênio entre o GML e o grupo imidazol do BNZ poderia explicar esse achado. Para o sistema BE (Figura 12d), sugere-se uma fraca interação BNZ/GMS devido à presença de uma fraca banda de absorção de IR em 1365 cm^{-1} . Mudanças significativas na intensidade das bandas OH para as misturas fármaco/excipientes são encontradas quando comparadas aos MGs puros. Esses resultados são apoiados pela literatura, que relata interações de hidrogênio entre o grupo imidazol do BNZ com carboxilatos em cocristais (Bezerra *et al.*, 2020). A ausência de alterações na banda de absorção de N-H para o BNZ sustenta a hipótese de que a interação BNZ/MGs ocorre preferencialmente via grupo imidazol. A interação do hidrogênio entre esses constituintes foi ainda mais explorada considerando as análises de ^1H RMN.

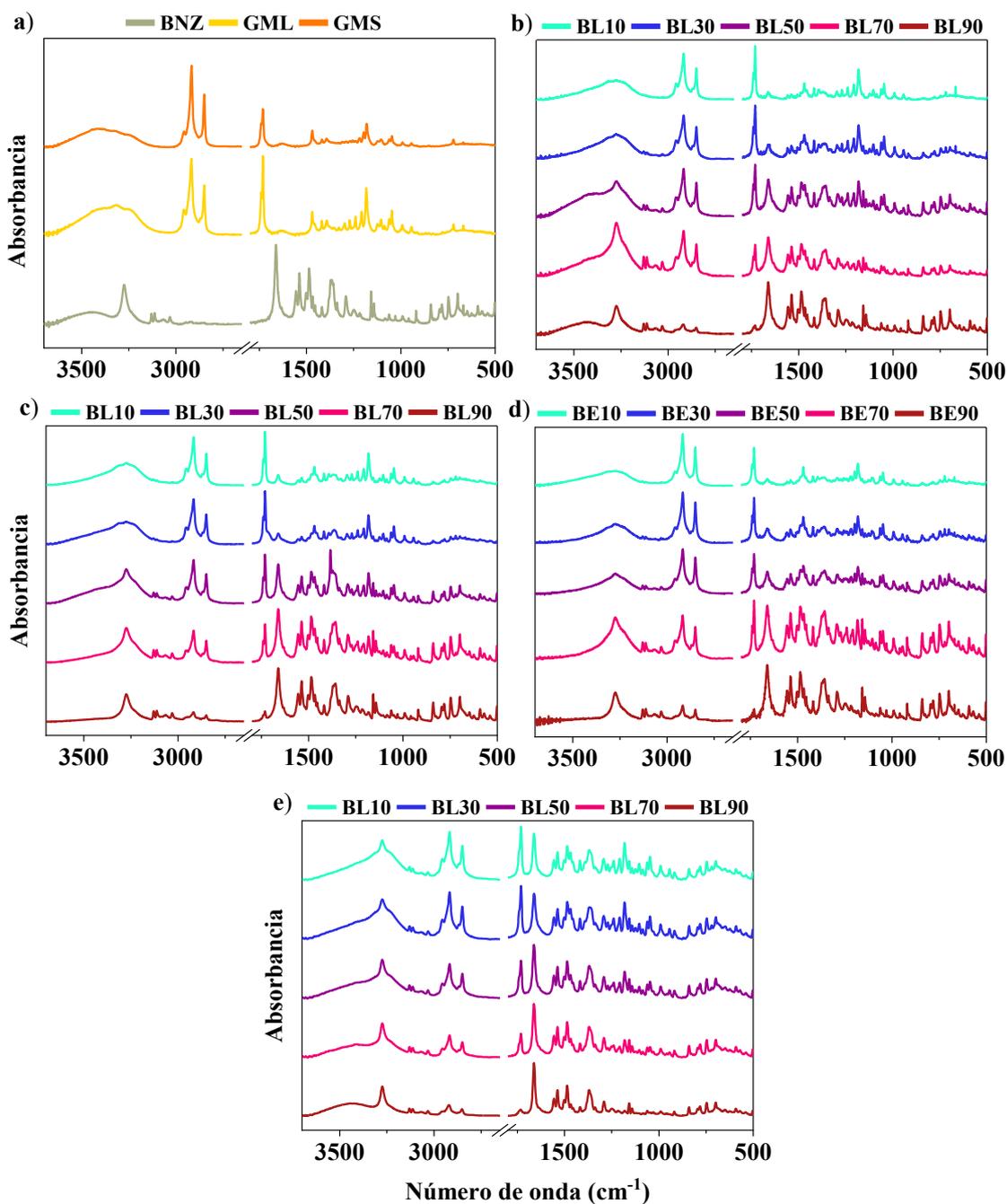


Figura 12. Espectros de infravermelho de misturas de componentes puros (a) obtidos através de fusão (b), maceração (c, d) e moagem de bolas (e).

4.1.4.5 Microscopia eletrônica de varredura

Nas análises de SEM, o pó nativo do BNZ assume a forma de cristais prismáticos em formato de agulhas (Figura 14a e c), conforme já relatado (Palmeiro-Roldán *et al.*, 2014b). O processo de maceração (Figura 14b) levou à redução do tamanho das partículas

do BNZ, como esperado. Para o GML (Figura 14d), foram observadas partículas esféricas com pequenos aglomerados e aparência superficial mais uniforme. A natureza esférica do GML puro é uma indicação de um sólido maleável ou de fácil manuseio. No GMS (Figura 14e), as partículas pulverulentas aparecem como lamelas finas que não são tão uniformes e “lisas” como no GML.

Observa-se uma uniformidade na morfologia das partículas em todas as misturas até atingir a proporção de 30% de fármaco, indicando compatibilização. Quando as amostras de BL foram analisadas, a presença de BNZ com o mesmo formato inicial é constatada a partir da proporção de 70:30 para todas as condições de processamento (Figura 14h, 14m e 14r). Para o BE, o mesmo formato do BNZ é observado na proporção 50:50 (Figura 14w).

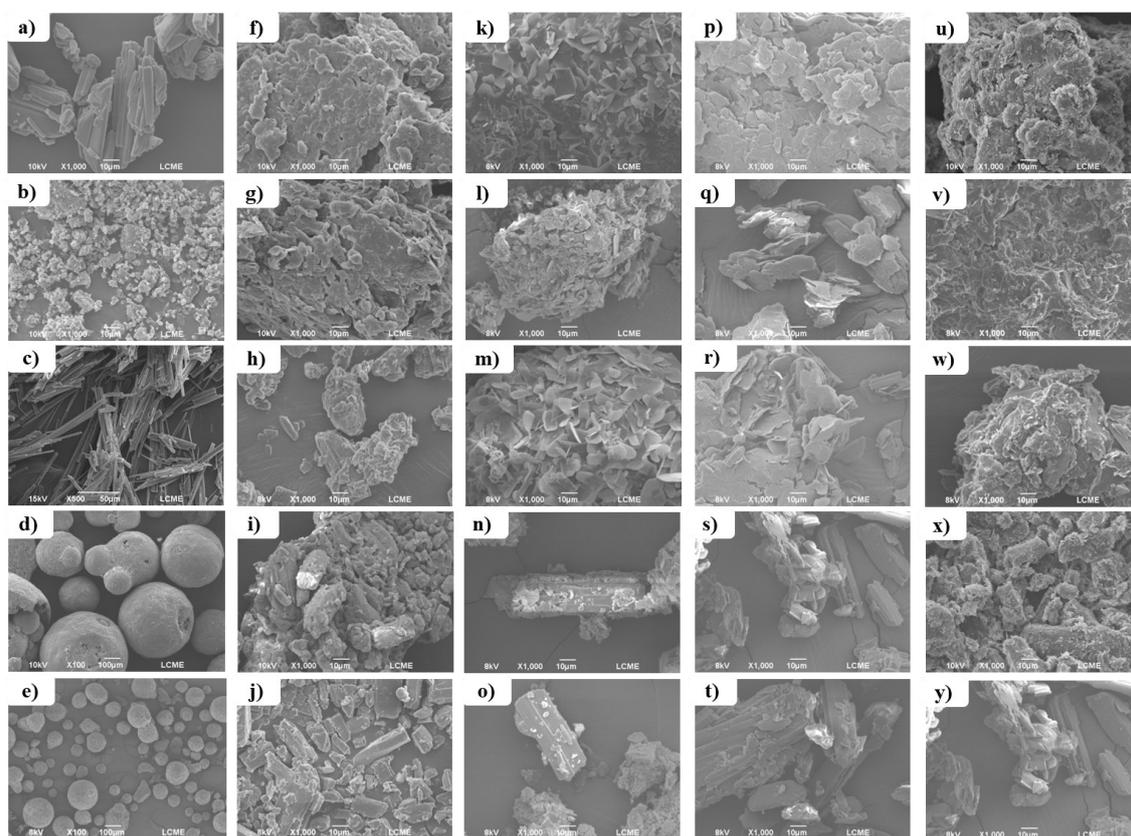


Figura 13. Análises SEM para BNZ puro (a), BNZ macerado (b), BNZ recristalizado utilizando acetona (c) GML e GMS puro (d-e) e misturas binárias (f-y). As misturas binárias foram preparadas em diferentes proporções, que aparecem na seguinte ordem de cima para baixo: 10, 30, 50, 70 e 90% de BNZ. BL foi macerado (f-j), moído (k-o) e derretido (p-t), enquanto BE foi apenas macerado (u-y).

4.1.5 Caracterização do estado líquido

4.1.5.1 RMN de ^1H

Na análise de RMN de ^1H (Figura 15), foi observado um desvio químico de 0,01 ppm de 2,85 ppm no BL50, que foi associado ao H_f do BNZ. A formação da ligação de hidrogénio entre BNZ e GML pode ser a razão para esta descoberta. GML puro apresentou dois singletos a 2,84 e 2,87 ppm (-OH), enquanto apenas um sinal a 2,86 ppm (s) foi observado com a mistura. Também foi observada uma redução na resolução do pico na faixa entre 3,50 e 4,10 ppm, que está relacionada ao H_f de C-H e $\text{CH}_2(\text{h})$ entre OH e $\text{CH}_2(\text{e})$ (cadeia C=O). Estas alterações espectrais resultam da ligação de hidrogénio estabelecida entre o grupo imidazol do BNZ e a cabeça polar do GML.

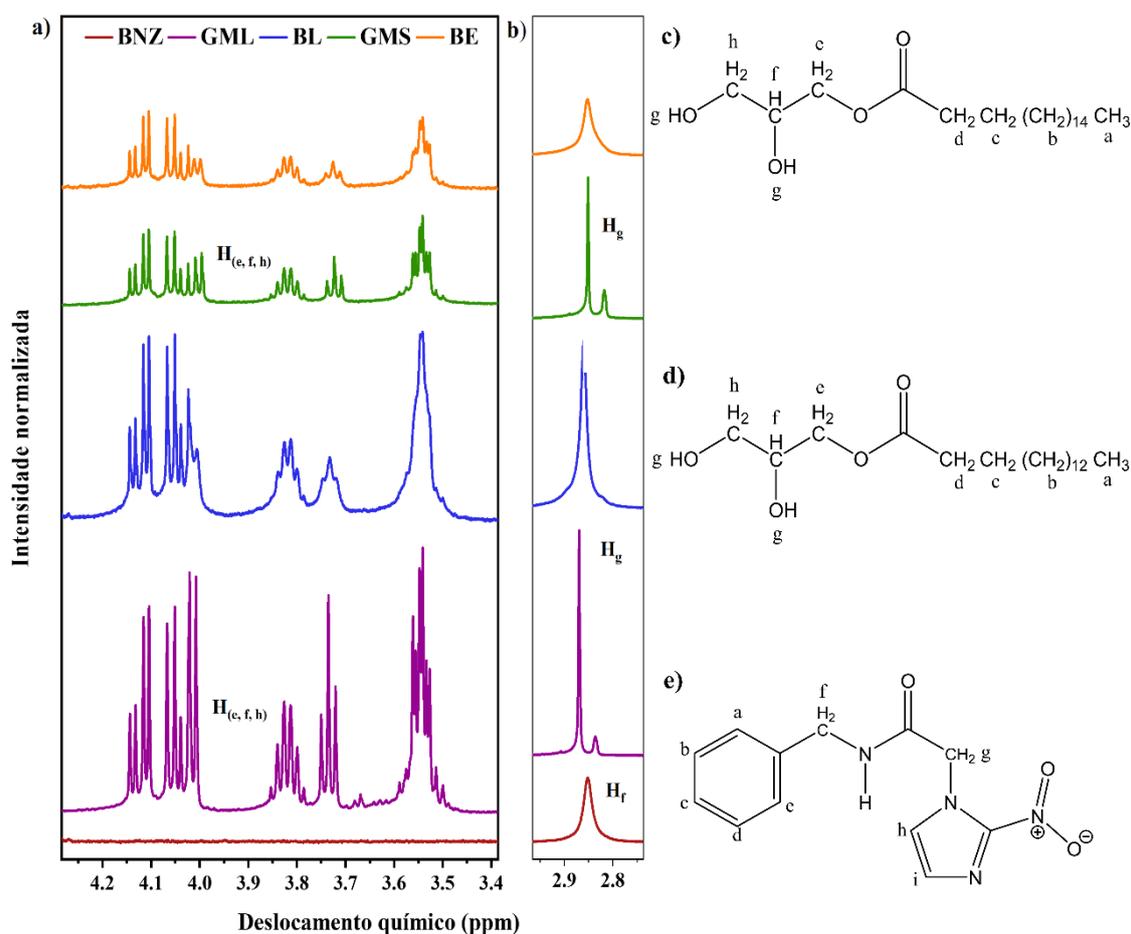


Figura 14. Espectros de RMN de ^1H de componentes puros e misturas BL e BE em acetona deuterada apresentados em duas diferentes aproximações do mesmo (a, b), bem como as estruturas químicas para GMS (c), GML (d) e BNZ (e). Os espectros completos estão apresentados na Figura 18 e Anexo 2 a 5.

Estudos relataram alterações espectrais em termos de deslocamento químico e acoplamento de sinais para o BNZ devido às interações de hidrogênio em uma mistura com outros materiais. Lyra et al., (2012), por exemplo, relataram mudanças químicas de hidrogênios H_g, H_i e H_a em RMN de ¹H como resultado de interações do BNZ e β-ciclodextrina. Sousa et al., (2021), por sua vez, mostraram uma interação de hidrogênio do BNZ com PEG 4000 e derivados usando RMN de ¹³C.

BE50 também apresentou uma sobreposição dos sinais de OH, mas nenhuma alteração no deslocamento químico de H_f do BNZ foi observada, indicando uma interação fraca entre os componentes, bem como interação de hidrogênio (Lima, 2012). Por fim, a análise de RMN de ¹H não mostrou a presença de impurezas, o que é uma informação importante, considerando que medicamentos e excipientes muitas vezes podem reagir e formar produtos de degradação.

Deslocamentos químicos (δ): **BNZ** (δ (ppm) = 2.06 (qui) (acetona); 2.85 (s) (H_f); 4.45 (d) (H_h); 5.31 (s) (H_g); 7.14 (d) (H_e); 7.26 (m) (H_{b, c, d}); 7.32 (d) (H_i); 7.52 (d) (H_a) e 7.97 (s). **GML** (δ (ppm) = 0.88 (t) (H_a); 1.29 (m) (H_b); 1.59 (qui) (H_c); 2.05 (qui) (acetone); 2.32 (t) (H_d); 2.84 (s), 2.87 (s) (H_g); 3.55 (m), 3.73 (t), 3.83 (sex) e 4.09 (m) (H_{e, f, h}). (Alexandri *et al.*, 2017; Ghandi *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2018; Taresco *et al.*, 2016) **BL505** (δ (ppm) = 0.87 (t); 1.28 (m); 1.59 (qui); 2.05 (qui); 2.31 (t); 2.86 (s); 3.54 (m); 3.73 (t); 3.82 (sex); 4.09 (m); 4.45 (d); 5.31 (s); 7.14 (d); 7.26 (m); 7.32 (d); 7.52 (d) e 7.98 (s). **GMS** (δ (ppm) = 0.87 (t) (H_a); 1.28 (m) (H_b); 1.59 (qui) (H_c); 2.05 (qui) (acetone); 2.32 (t) (H_d); 2.82 (s), 2.85 (s) (H_g); 3.54 (m), 3.73 (t), 3.82 (sex) e 3.97 to 4.18 (m) (H_{e, f, h}). **BE5050** (δ (ppm) = 0.87 (t); 1.28 (m); 1.59 (qui); 2.05 (qui); 2.31 (t); 2.85 (s); 3.54 (m); 3.73 (t); 3.82 (sex); 3.97 to 4.18 (m); 4.45 (d); 5.31 (s); 7.14 (d); 7.26 (m); 7.32 (d); 7.52 (d) e 7.98 (s).

4.1.5.2 Ensaios de solubilidade aparente

Nos ensaios de solubilidade aparente (Figura 16), uma mistura física de matéria-prima em pó (So) ou macerada (Ma) foi adicionada ao PBS antes da adição a este meio. A solubilidade do BNZ em PBS foi de 0,223 ± 0,004 mg (Honorato *et al.*, 2014; Maximiano; Costa; Souza, 2010). Tanto o GML como o GMS contribuíram para melhorar a solubilidade do BNZ, com exceção das amostras BE50Ma, BE90Ma e BE90So (não foram encontradas diferenças significativas para estas amostras).

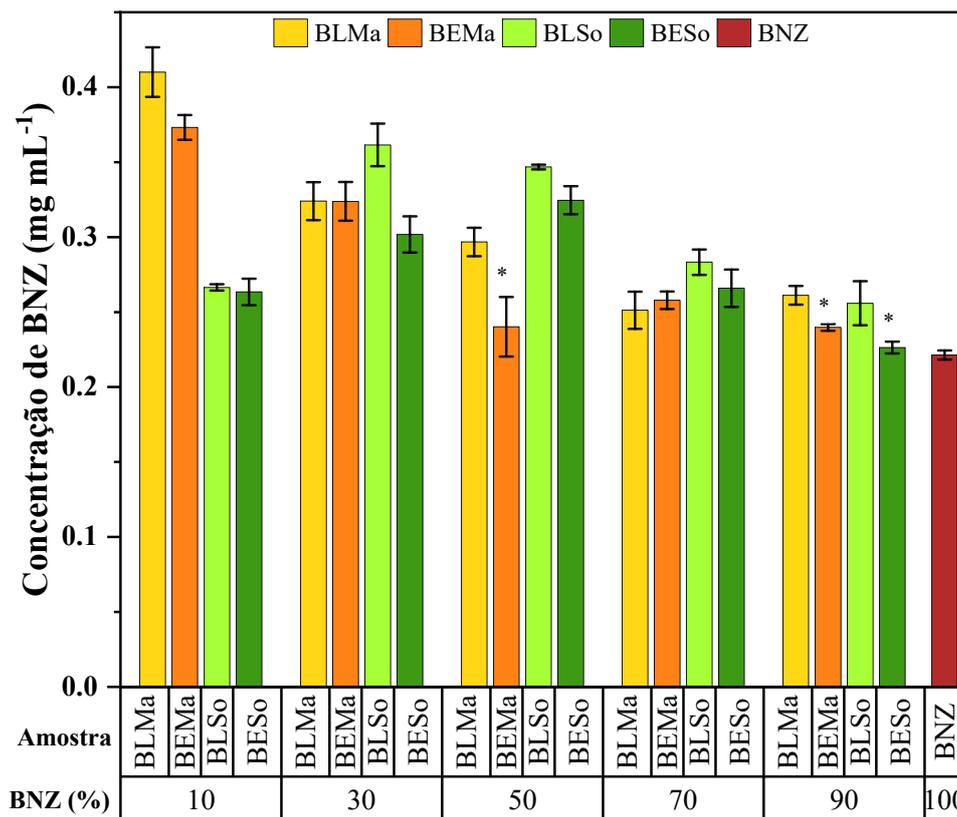


Figura 15. Solubilidade aparente do BNZ em tampão PBS (n=4), mistura MG/BZ macerada (BLMa e BEMa) e mistura física MG/BZ (BESo e BLSo). *indicam diferenças não estatisticamente significativas em relação ao BNZ.

Misturas preparadas com maior teor de GML ou GMS levaram a maior solubilização do fármaco. Os maiores valores de solubilidade foram $0,410 \pm 0,0165$ e $0,373 \pm 0,0082$ mg mL⁻¹ para misturas com GML e GMS, respectivamente. Diferenças no grau de cristalinidade do material poderiam contribuir para explicar esses achados. De fato, foi encontrada uma menor intensidade de picos de difração de MGs e BNZ para misturas contendo menor teor de BNZ (seção 3.1.4.3), o que facilitaria o acesso da água à estrutura do material. Embora a maceração tenha reduzido o tamanho do cristal, conforme observado nas análises de SEM (seção 3.1.4.5) e também relatado na literatura (Maximiano *et al.*, 2011a), nenhuma correlação entre este atributo e a solubilidade do medicamento foi encontrada. Dos dois MGs testados, o GML foi mais eficaz no aumento da solubilidade do BNZ, o que pode estar relacionado à sua morfologia relatada nas análises SEM e à sua natureza menos hidrofóbica. Outra hipótese é que uma ligação mais forte com o GML resultaria em maior desorganização da molécula de BNZ, facilitando a solvatação da molécula e sua solubilização.

4.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Neste estudo, o BNZ foi utilizado como modelo para estudar a interação fármaco-monoglicerídeos em misturas a serem utilizadas em formulações farmacêuticas. O GML foi mais eficaz no aumento da solubilidade do BNZ, o que pode estar relacionado as propriedades melhoradas das partículas relatadas nas análises SEM, natureza menos hidrofóbica e interação mais forte com o BNZ (confirmado por FTIR, RMN de ^1H). Observou-se que a interação droga-excipiente envolve a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo imidazol do BNZ e a região polar do GML. O aumento da solubilidade do BNZ em misturas apresentando maiores proporções de monoglicerídeos, é provavelmente explicado pela redução do grau de cristalinidade e/ou temperatura de fusão do BNZ. Além de melhorar a solubilidade, esse monoglicerídeo (GML), poderia reduzir o efluxo intestinal de BNZ, problema que também limita sua biodisponibilidade oral. Por outro lado, mais estudos precisam ser realizados neste contexto.

Ambos os métodos de alta e baixa energia afetaram as propriedades térmicas do BNZ durante o processamento de misturas em pó, mas foram encontradas alterações marginais na cristalinidade do medicamento. Portanto essas técnicas poderiam ser utilizadas de forma intercambiável, visto que características semelhantes foram obtidas para a mistura de pós. Para a indústria farmacêutica, a utilização de métodos de baixo consumo energético é vantajosa do ponto de vista da redução de custos. Embora a amorfização do medicamento normalmente contribua para melhorar a sua solubilização, mais desafios são levantados, como evitar a recristalização durante o armazenamento e alterações subsequentes no desempenho da formulação (por exemplo, liberação do medicamento). Por outro lado, a forma cristalina de um fármaco resulta em menores variações no perfil de liberação, evitando flutuações na concentração plasmática. Como o tratamento térmico e mecânico não se mostrou suficiente para melhorar a solubilidade via redução da cristalinidade, outras estratégias como obtenção de co-cristais, sais ou pró-fármacos deverão ser investigadas em estudos futuros.

5. CAPÍTULO III

Método cromatográfico para quantificação de BNZ por cromatografia líquida de alta resolução

Resumo

O benznidazol (BNZ) é o único fármaco no Brasil utilizado para o tratamento da doença de Chagas (DC). A baixa solubilidade e elevada cristalinidade do BNZ limita as técnicas analíticas de quantificação que podem ser utilizadas, sendo ainda mais difícil quando se faz necessário ensaios de permeação em mucosa. A presença de proteínas e outros contaminantes presentes na mucosa, impedem a quantificação por instrumentos de UV-vis simples, sendo necessário a utilização de técnicas mais sofisticadas. A necessidade da utilização de solventes voláteis, necessita de métodos analíticos robustos, precisos e ágeis. Neste contexto, será avaliada a quantificação de BNZ após ensaios de permeabilidade com mucosa oral de suínos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV-Vis (324 nm). Apesar dos solventes acetonitrila e etanol não apresentarem os maiores resultados de solubilidade, foram os mais adequados para os testes de recuperação e seletividade. O método foi performed utilizando uma coluna C18 de 150 mm × 4,5 mm × 5 µm, fase móvel isostática de 0,5 mL min⁻¹ de H₂O/ACN (60:40) (v/v) e tempo de corrida de 12,5 min e temperatura de 35°C. Os dados apontam que o método se mostrou preciso, reprodutível e adequado para analisar BNZ após o contato com a mucosa oral. Os resultados obtidos neste capítulo foram obtidos em parceria com o Laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos e cosméticos (LTMAC) no Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB) - DF.

Palavra-chave: Benznidazol, método bioanalítico, HPLC, permeação em mucosa.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Materiais

O medicamento padrão Benznidazol (BNZ) (> 99%) foi fornecido pela LAFEPE (Recife, PE, Brasil). O acetonitrila de grau HPLC foi obtido de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Cetona, etanol e metanol foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil). A água utilizada nos experimentos foi água ultrapura grau Milli-Q® (Millipore, Illkirch Graffenstaden, França).

5.1.2 Caracterizações FÍSICO-QUÍMICAS

5.1.2.1 *Análise térmica*

Os termogramas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizados a uma taxa de aquecimento de 1 °C min⁻¹ sob atmosfera inerte de nitrogênio (50 mL min⁻¹) na faixa de temperatura de -5 a 200 °C, em um DSC-60 (Shimadzu, Tóquio, Japão). A Equação (3) de Van't Hoff foi usada para determinar a pureza do BNZ através de resultados de DSC (Van Dooren; Müller, 1984).

$$T_m = T_0 - \frac{RT_0\chi}{\Delta H_0} \frac{1}{F} \text{ Equação (3)}$$

Onde T_m é a temperatura observada da amostra; T_0 é a temperatura de fusão da amostra pura (100%); χ é a fração molar das impurezas; ΔH_0 é o calor de fusão da amostra pura, e F é fração de material fundido, que é determinada através da medida das áreas parciais do pico de fusão experimental. (Van Dooren; Müller, 1984)

5.1.2.2 *Ressonância magnética nuclear ¹H*

As amostras foram solubilizadas em (CD₃)₂CO e registradas em espectrômetro NMR de 400 MHz (Varian, modelo NMR AS400), nas especificações de 12 varreduras, largura espectral de 20,62 ppm e 64.000 pontos de dados brutos.

5.1.3 Validação do método cromatográfico

O método analítico foi validado de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) no que diz respeito aos parâmetros de seletividade,

linearidade, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ, respectivamente), precisão e exatidão (European Medicines Agency, 2019).

5.1.3.1 *Preparação de soluções padrão*

As soluções concentradas primárias de BNZ (200 mg L^{-1}) foram preparadas dissolvendo 10 mg da substância padrão em 50 mL de acetonitrila. Essas soluções foram feitas sempre que um experimento foi realizado para minimizar a evaporação variável do solvente.

5.1.3.2 *Instrumentação e condições analíticas*

A quantificação do fármaco foi realizada utilizando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japão), que consiste em um desgaseificador (DGU-20A3), uma bomba (LC-20D), um forno (CTO-20AS), um detector espectrofotométrico DAD (SPD-20A) e um injetor automático de amostra (9SIL-20AD). Uma coluna C18 de fase reversa medindo $150 \text{ mm} \times 4,5 \text{ mm} \times 5 \text{ }\mu\text{m}$ (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi usada como fase estacionária. A fase móvel isostática fluiu a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ de proporção $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ de 60:40 (v/v) e 12,5 min de tempo de execução. O forno da coluna foi mantido a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todas as análises. O volume de injeção de cada amostra foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e a detecção foi registrada em 324 nm (Tolentino *et al.*, 2023a).

5.1.3.3 *Preparação de extratos de mucosa e seletividade*

A mucosa bucal suína foi obtida no frigorífico local Via Carnes (Formosa, GO, Brasil), logo após o abate dos animais e antes da descamação. A mucosa foi mantida úmida com tampão HEPES pH 7,4 (10 mol L^{-1}), sob refrigeração durante o transporte até o laboratório (Saatkamp *et al.*, 2023a). O extrato de mucosa foi obtido cortando fragmentos de $1,5 \text{ cm}^2$ em pequenos pedaços e colocando-os em frascos de vidro herméticos com 5 mL de cinco solventes diferentes: acetonitrila, etanol, metanol, acetona e água. Após agitação durante 8 horas à temperatura ambiente e 200 rpm, as amostras foram filtradas através de membranas de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e analisadas utilizando o método HPLC-UV (Tolentino *et al.*, 2023a). A análise foi realizada em triplicata para cada extrato de mucosa, e a comparação entre áreas de pico e tempos de retenção foi avaliada pelo teste *t* de Student ($p = 0,05$).

5.1.3.4 Linearidade

Três soluções de BNZ (200 mg L⁻¹) em ACN foram preparadas independentemente, e alíquotas dessas soluções foram diluídas com ACN para obter nove concentrações diferentes (0,05, 0,1, 1,0, 5,0, 10, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹). Após análise cromatográfica, a concentração e a área do pico foram plotadas e ajustadas usando regressão linear de mínimos quadrados. Os testes de proporcionalidade e significância do coeficiente angular foram avaliados pelo teste t de Student ($p = 0,05$). A razão entre a área do pico e a concentração do fármaco foi considerada para o cálculo dos fatores de resposta. Os resíduos foram calculados a partir da curva de calibração com base na diferença entre os valores teóricos e experimentais.

5.1.3.5 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Os cálculos para determinação de LOD e LOQ foram baseados nos desvios padrão (σ) e nas inclinações (S) das três curvas de calibração, conforme Equações 4 e 5 (Tolentino *et al.*, 2023a):

$$\text{LOD} = 3,3 \sigma / S \text{ (Equação 4)}$$

$$\text{LOQ} = 10 \sigma / S \text{ (Equação 5)}$$

5.1.3.6 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (intraensaio) foi verificada utilizando três amostras em diferentes concentrações (1,0, 50,0 e 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com três repetições de cada amostra. Dois analistas avaliaram a precisão intermediária em dois dias diferentes (interensaio). Os resultados de precisão foram expressos como coeficiente de variação (CV), calculado de acordo com a Equação 6:

$$\text{CV} = (\text{desvio padrão da média}/\text{concentração média}) \times 100 \text{ (Equação 6)}$$

5.1.3.7 Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado utilizando ampolas de vidro. Um excesso de BNZ foi adicionado em 5 mL de 5 diferentes solventes e os frascos selados (água, metanol, etanol, acetona e acetonitrila). Em seguida permaneceram em agitação a 200

rpm e temperatura ambiente, por 24 horas. Após o equilíbrio, as ampolas foram abertas e a solução foi filtrada através de uma membrana de 0,45 μm , e analisados utilizando o método de HPLC-UV. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.1.3.8 Recuperação

A escolha do solvente para realizar a extração e recuperação do BNZ da mucosa oral suína foi realizado em 5 solventes diferentes, água, metanol, etanol, acetonitrila e acetona. 1,5 cm^2 de mucosa foi cortado em fragmentos, colocada em frascos de vidro herméticos e impregnada com 1 mL de uma solução de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. Após a completa evaporação do solvente (acetonitrila), foram adicionados 5 mL dos respectivos solventes e o sistema ficou sob agitação durante 8 horas à 200 rpm em temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram filtradas através de membranas de 0,45 μm e analisadas utilizando o método HPLC-UV. A análise foi realizada em triplicata para cada contaminante, e a comparação entre áreas de pico e tempos de retenção foi avaliada pelo teste t de *Student* ($p = 0,05$).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2.1 Determinação do grau de pureza do BNZ

No domínio da HPLC a utilização de materiais puros é um pré-requisito essencial para a validação eficaz do método. Isso dito, impurezas ou contaminantes presentes nas amostras podem distorcer significativamente os picos cromatográficos, comprometer a eficiência da separação e, em última análise, produzir dados quantitativos e qualitativos imprecisos. Neste cenário, foram realizadas análises de RMN e DSC para confirmar a pureza do BNZ.

A Figura 17 mostra a curva DSC do BNZ utilizada para determinar a pureza do medicamento através da aplicação da Equação (3) de *van't Hoff*. A análise foi realizada com baixa taxa de aquecimento, uma vez que o equilíbrio térmico e termodinâmico é mais difícil de ser alcançado em altas taxas de aquecimento (van Dooren; Müller, 1984). O pico endotérmico em 188,4°C com um $\Delta_{\text{fus}}H$ de 29,9 J g⁻¹ corresponde ao ponto de fusão do fármaco (Saatkamp *et al.*, 2023c) e a pureza foi de 99,8%.

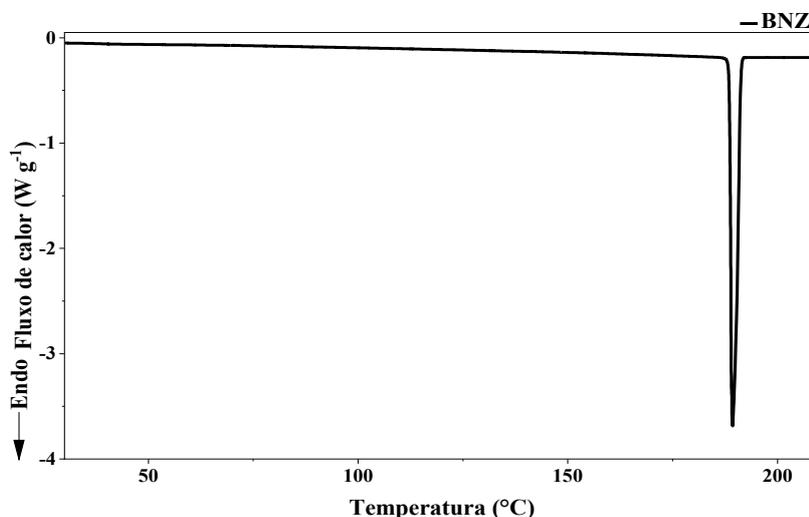


Figura 16. Curva DSC de benznidazol como fornecido para determinação de pureza através da equação de *van't Hoff*.

O espectro de RMN de ¹H do BNZ comprova a ausência de impurezas no fármaco conforme fornecido, pois exhibe exclusivamente sinais correspondentes ao solvente e ao BNZ (Figura 18). Isso reforça a adequação do material BNZ para aplicações críticas no desenvolvimento de métodos analíticos. Deslocamentos químicos para o BNZ (δ (ppm))

=2,06 (qui) (acetona); 2,85 (s) (H_f); 4,45 (d) (H_h); 5,31 (s) (H_g); 7,14 (d) (H_e); 7,26 (m) ($H_{b,c,d}$); 7,32 (d) (H_i); 7,52 (d) (H_a) e 7,97 (s).

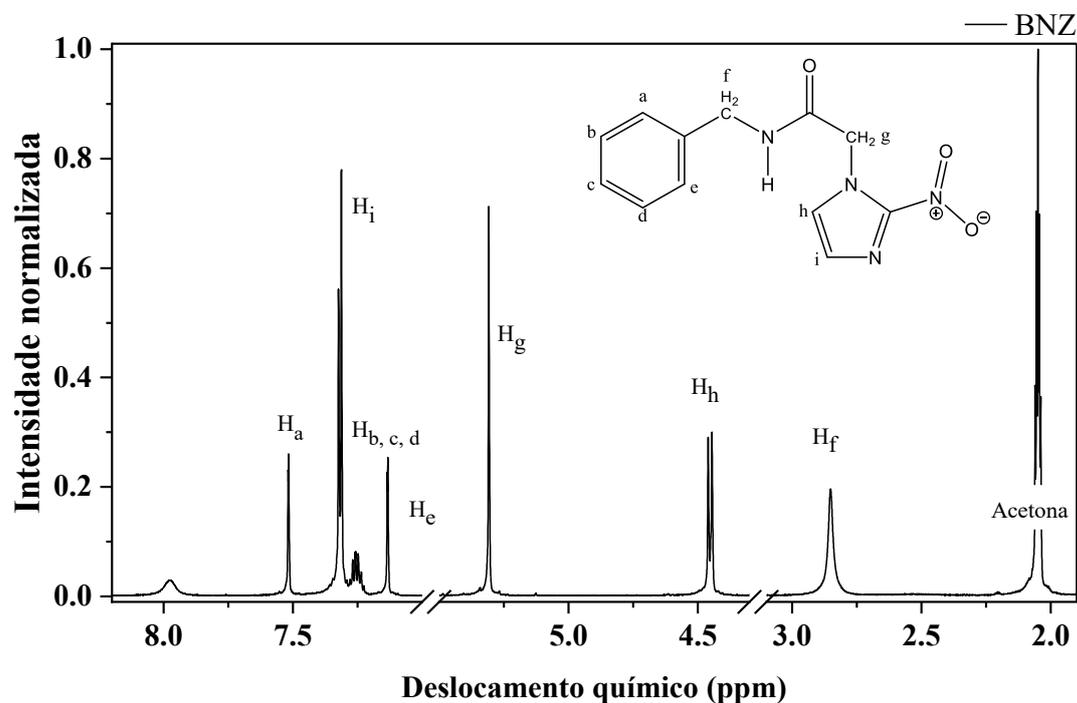


Figura 17. Estrutura molecular e espectro de RMN de 1H do benznidazol para verificar a presença de impurezas.

5.2.2 Estabelecimento das condições cromatográficas

Dada a natureza complexa da mucosa oral como um substrato biológico multifacetado suscetível de ter interferentes analíticos, este estudo concentrou-se principalmente na validação de uma metodologia discriminativa, precisa, sensível e robusta. O objetivo foi possibilitar a quantificação do BNZ na mucosa oral, facilitando assim sua aplicação em estudos de permeação para o avanço de produtos farmacêuticos inovadores que incorporem este composto.

Neste contexto analítico complexo, e devido à baixa polaridade inerente do BNZ, conforme indicado por um valor log P de 1,3 (Vieira Diniz *et al.*, 2023), a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa surge como a uma escolha proeminente para obter um método seletivo contra contaminantes da mucosa, ao mesmo tempo que permita a rápida eluição do analito.

Além disso, diferentes tipos de colunas, proporções de solventes orgânicos e vazões foram testados como fase estacionária e móvel, respectivamente. Somado a isso,

o pico de absorção de BNZ foi monitorado em uma faixa de comprimentos de onda de 190 a 900 nm. Os resultados desses experimentos indicaram que uma coluna C18, uma proporção de fase móvel de 60:40 (água:acetonitrila, v/v) e uma taxa de 0,5 mL min⁻¹ foram as condições mais adequadas para atingir um pico bem definido com tempo de retenção adequado (6,3 min) para potencialmente separar o fármaco dos interferentes da mucosa, e a absorção máxima de BNZ foi identificada em 324 nm.

Nessas condições cromatográficas, o fator de cauda foi 1,2 e o número de pratos teóricos excedeu 2000, ambos alinhados com os critérios considerados apropriados para um cromatográfico (Lucas-Abellán *et al.*, 2019) (Figura 19, linha verde musgo). Estas condições de fase estacionária e móvel já provaram ser eficazes para componentes com Log P semelhante ao do BNZ e para o próprio BNZ, sem contaminantes da mucosa oral (Kovačević *et al.*, 2022; Vieira Diniz *et al.*, 2023).

5.2.3 Desenvolvimento do processo para extração de fármacos da mucosa oral

Trabalhos anteriores demonstraram que o BNZ tem potencial para permear a mucosa oral, especialmente com intensificadores de permeação (Amaral *et al.*, 2020, 2021a). Logo, o BNZ pode formar ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com componentes da mucosa, que garantem a penetração na mucosa (Paderni *et al.*, 2012; Siegel, 1981). Além disso, as propriedades físico-químicas do BNZ, como log P e massa molar, podem facilitar a difusão do fármaco na mucosa (Amaral *et al.*, 2020; Smart, 2005a).

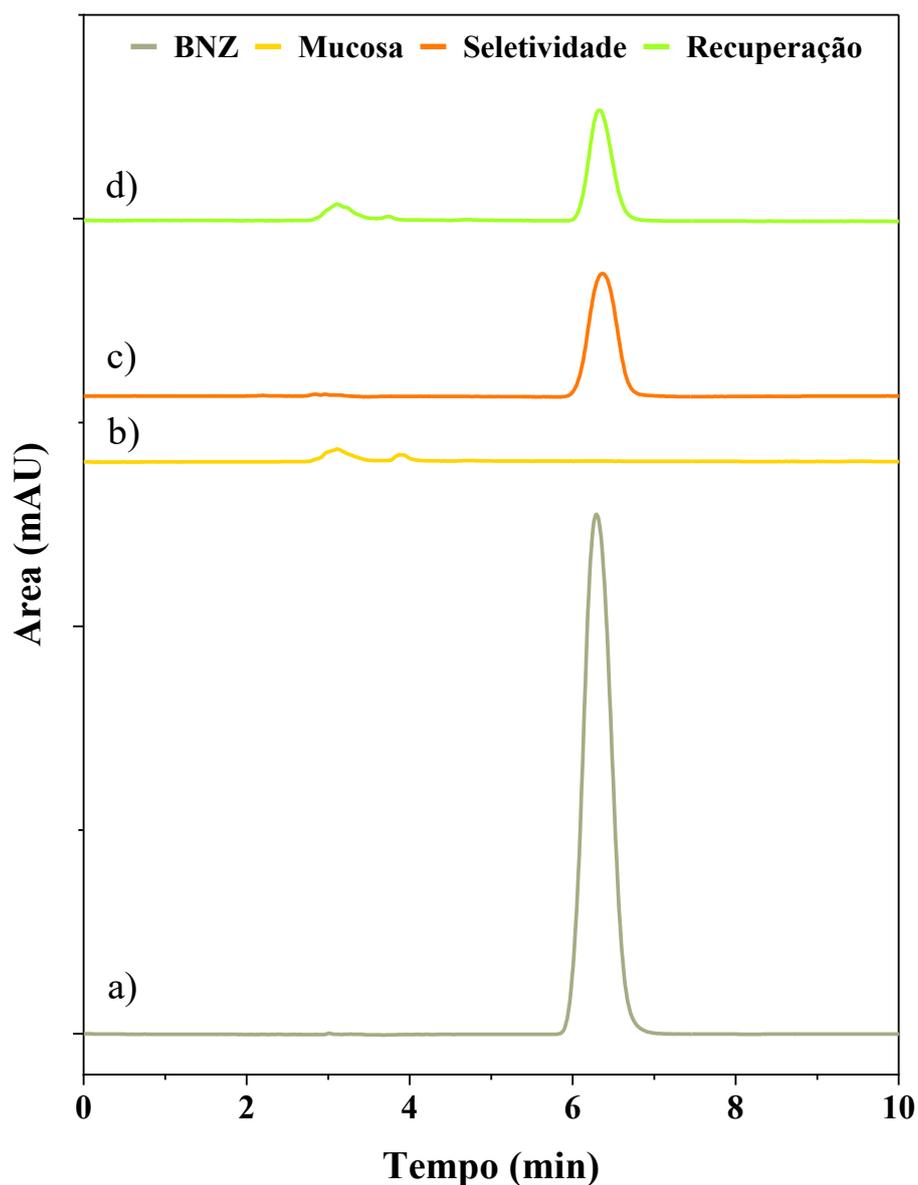


Figura 18. Cromatogramas de HPLC representativos de BNZ conforme fornecido diluído em acetonitrila (linha cinza), contaminantes da mucosa oral extraídos com acetonitrila (linha amarela), BNZ e contaminantes da mucosa oral diluídos em acetonitrila (linha laranja).

Portanto, extrair BNZ da mucosa apresentou-se uma tarefa desafiadora, necessitando de otimização do método. Conseqüentemente, água, metanol, etanol, acetonitrila e acetona foram selecionados como potenciais solventes para extração de BNZ. Primeiramente, para verificar a adequação desses solventes ao processo de extração, foi realizado um teste preliminar de solubilidade, cujos resultados estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Solubilidade do BNZ nos diferentes solventes determinada através de análise HPLC (n=3).

Solvente	Solubilidade do BNZ (g L ⁻¹)	CV (%) ^a
Água	0,19	0,3
Metanol	21,7	5,4
Etanol	5,6	4,4
Acetonitrila	11,4	4,2
Acetona	25,3	9,1

^a CV coeficiente de variação.

Uma vez que o BNZ se mostrou solúvel nos solventes selecionados, o método de extração foi padronizado (agitação magnética durante 8h à 200 rpm) para avaliar a influência dos diferentes solventes na extração do medicamento. De acordo com as diretrizes do ICH, os testes de recuperação não são obrigatórios para atingir 100% de recuperação do ingrediente ativo. Além disso, o consenso da literatura sugere que taxas de recuperação superiores a 70% são consideradas aceitáveis e evitam a necessidade de fatores de correção (Campos; Praça; Bentley, 2016; European Medicines Agency, 2019; Oliveira *et al.*, 2020; Reis *et al.*, 2018). De fato, todos os solventes testados exibiram recuperações ultrapassando o limite de 70%, afirmando sua eficiência para uso na extração de BNZ após estudo de permeação na mucosa (Tabela 6).

O volume de injeção da amostra equivale a 4% do volume total introduzido na coluna, significando que 4% corresponde ao solvente do frasco, enquanto 96% compreende a mistura da fase móvel. Embora esta quantidade mínima de diluente do frasco não tenha impactado o tempo de retenção do BNZ, resultou em características analíticas distintas dentro do pico, conforme detalhado na Tabela 7.

Todos os solventes de extração puderam gerar picos cromatográficos com resolução superior a 2,0, garantindo confiabilidade analítica (Tabela 7) (Tolentino *et al.*, 2023b). No entanto, embora a recuperação do medicamento e a resolução dos picos atendam aos padrões satisfatórios, quase todos os solventes não conseguiram fornecer as características cromatográficas necessárias para pratos teóricos, ou fator de simetria, ou ambos.

Água, metanol e acetona apresentam valores médios de fator de simetria de 1,48, 1,34 e 1,23, respectivamente, ou seja, todos fora do valor considerado ótimo (1,2; (Czyrski; Sznura, 2019)). No entanto, a acetona está dentro do limite aceitável de 1,2 e pode ser contemplada como um diluente viável para extração e subsequente injeção por HPLC. Por outro lado, é importante notar que o número de pratos teóricos alcançados com acetona foi de 1682, o que fica aquém do valor mínimo considerado ideal (2000; (Lucas-Abellán *et al.*, 2019)). Além disso, assim como a acetona, o uso do etanol como solvente de extração resultou em um número inadequado de pratos teóricos (Tabela 7).

Tabela 7. BNZ recuperado da mucosa oral suína por extração com água, metanol, etanol, acetonitrila e acetona.

	Água	Metanol	Etanol	Acetonitrila	Acetona
BNZ TC (mg L⁻¹)	10	10	10	10	10
BNZ MC (mg L⁻¹)	7,64 ± 0,58	7,75 ± 0,29	8,37 ± 0,32	8,59 ± 0,52	7,53 ± 0,74
BNZ MC (%)	76,41 ± 5,8	77,49 ± 2,9	83,68 ± 3,2	85,9 ± 5,3	75,29 ± 7,4
CV (%)	5,41	1,48	1,75	4,12	7,64
RT (min)	6,45 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,33 ± 0,02	6,38 ± 0,08
PFS	1,48 ± 0,02	1,34 ± 0,05	1,18 ± 0,01	1,15 ± 0,02	1,23 ± 0,07
PR	5,18 ± 1,31	5,53 ± 1,66	4,13 ± 1,43	4,12 ± 0,64	2,97 ± 0,33
NTP	6069 ± 74	3009 ± 14	1837 ± 20	2210 ± 93	1682 ± 12

Os dados correspondem à média de 6 determinações ± desvio padrão. TC: Concentração teórica; MC: Concentração medida; CV: Coeficiente de variação; RT: Tempo de retenção; PFS: Fator de simetria de pico; PR: Resolução do pico; NTP: Números de pratos teóricos.

Assim, a acetonitrila surge como o solvente ideal para a extração de BNZ da mucosa oral. Exibindo a maior taxa de recuperação do fármaco e número de pratos teóricos, resolução de pico e fatores de simetria dentro dos limites aceitáveis para um método analítico robusto (Tabela 7). Portanto, a acetonitrila foi selecionada como meio diluente para todos os testes de validação do método analítico.

5.2.4 Validação do método

A associação entre a área do pico do BNZ nas amostras de acetonitrila e suas respectivas concentrações (variando de 0,05 a 100,0 mg L⁻¹) demonstrou linearidade,

determinada pelo método dos mínimos quadrados (Figura 20). Notavelmente, a equação de regressão assumiu a forma $A = 65779C - 11634$, onde A representa a área do pico e C significa a concentração de BNZ. Além disso, o coeficiente de correlação para as curvas padrão situou-se em 0,9999, indicando uma probabilidade robusta de correlação dentro dos limites definidos. Além do mais, LOD e LOQ foram calculados como $0,005 \text{ ug mL}^{-1}$ e $0,015 \text{ ug mL}^{-1}$ respectivamente. Estes valores são adequados para a quantificação de baixas concentrações de BNZ, recuperado da mucosa em ensaios de permeação de fármacos.

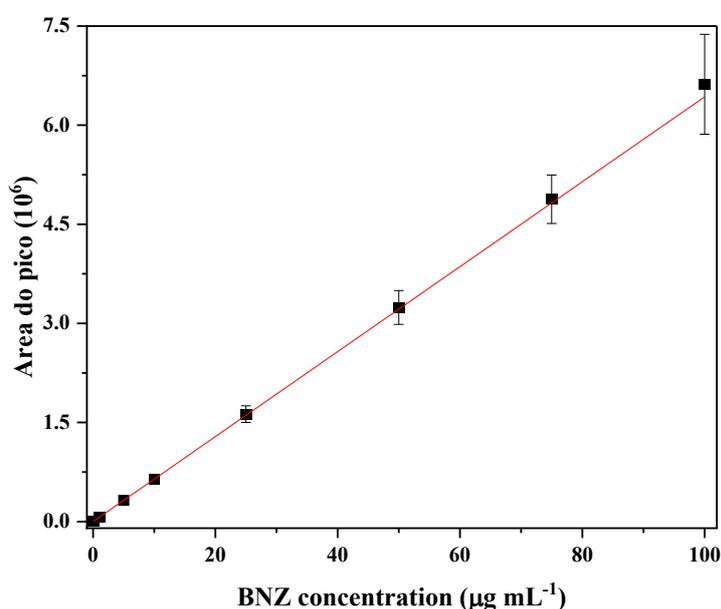


Figura 19. Regressão linear da curva de quantificação.

A repetibilidade do método, avaliada em três concentrações diferentes de BNZ, rendeu valores de coeficiente de variação abaixo de 1% (Tabela 8), significando sua capacidade de produzir consistentemente respostas analíticas uniformes. Além disso, em termos de precisão intermediária, os valores de CV permaneceram próximos de 5%, mesmo considerando variações de analistas e datas de análise (Tabela 9). Estes resultados sublinham a fiabilidade do método na manutenção da consistência analítica, particularmente para concentrações mais baixas, que são de particular importância, dado que a maioria das experiências de permeação em mucosas envolvem pontos de dosagem com concentrações mais baixas.

Tabela 8. Valores médios de repetibilidade \pm desvio padrão para 6 repetições em três concentrações diferentes.

Repetibilidade	BNZ RT (min)	PSF	PR	NTP	[BNZ] (ug mL ⁻¹)	CV (%)
1	6,49 ± 0,01	0,97 ± 0,02	5,84 ± 2,40	1684 ± 29	1,12	0,76
50	6,48 ± 0,02	1,02 ± 0,01	5,38 ± 0,63	1704 ± 9	49,94	0,12
100	6,47 ± 0,03	1,11 ± 0,03	5,51 ± 2,68	1821 ± 26	101,10	0,20

Os dados correspondem à média de 6 determinações ± desvio padrão. RT: Tempo de retenção; PSF: Fator de simetria de pico; PR: Resolução de pico; NTP: Números de pratos teóricos; [BNZ]: Concentração mensurada; CV: coeficiente de variação.

Tabela 9. A precisão do método HPLC-UV para determinação de BNZ em soluções de acetonitrila.

Concentração teórica (ug mL ⁻¹)	Concentração experimental (ug mL ⁻¹)		CV (%)
1	1,17 ± 0,06		4,53
50	49,43 ± 3,89		6,59
100	100,10 ± 5,04		8,16
Analista 1	Dia 1	Dia 2	
1	1,15 ± 0,06	1,10 ± 0,02	4,52
50	48,20 ± 3,89	47,24 ± 3,20	6,59
100	96,41 ± 11,49	97,55 ± 6,07	8,16
Analista 1	Dia 1	Dia 2	
1	1,09 ± 0,06	1,14 ± 0,03	3,87
50	46,26 ± 2,52	50,14 ± 0,37	4,18
100	102,25 ± 4,55	99,70 ± 0,83	3,71

Os dados correspondem à média de 3 determinações ± desvio padrão.

A seletividade do método foi avaliada quantificando o BNZ na presença de matrizes biológicas, conforme ilustrado na linha laranja da Figura 19. Os resultados da análise de variância do teste t de *Student* não revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em termos de áreas de pico entre amostras contaminadas e não contaminadas. Além disso, não foram observadas alterações no tempo de retenção do BNZ, mesmo na presença de todos os interferentes testados. Conseqüentemente, fica estabelecido que o método analítico possui seletividade na quantificação do BNZ, mesmo quando coexiste com componentes extraídos da mucosa.

Finalmente, a precisão do método foi determinada avaliando a quantidade de BNZ recuperada das matrizes biológicas. Como já mostrado na Tabela 7, a recuperação de BNZ da mucosa oral foi altamente satisfatória, sugerindo um procedimento de extração reprodutível, uma vez que o coeficiente de variação dentro das amostras analisadas ficou dentro da faixa recomendada para este tipo de ensaio em amostras biológicas, ou seja, menos de 15% (Mishra *et al.*, 2018).

5.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O tratamento de doenças negligenciadas como a DC carece de ativos farmacológicos efetivos e necessitam do desenvolvimento de novas formulações farmacológicas contendo BNZ, como uma alternativa a administração via oral e de baixo custo. Uma alternativa promissora é a administração via mucosa oral utilizando filmes poliméricos muco adesivos carregados com o fármaco. Para avançar nesta área, é necessário desenvolver um método analítico que seja capaz de quantificar com precisão o BNZ na presença de matrizes biológicas (mucosa), possibilitando estudos de permeabilidade. Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método robusto para recuperar e quantificar BNZ da mucosa em concentrações compatíveis com estudos de permeação, possibilitando o desenho de novas formulações, permitindo especificamente ensaios de desempenho *ex vivo* e *in vivo* em tecidos alvo. O método proposto será de fundamental importância no desenvolvimento do capítulo seguinte e o material está em finalização de edição para submissão à revista *Journal of Chromatography B*.

6. CAPÍTULO IV

Filmes mucoadesivos de quitosana com BNZ de baixo custo para o tratamento da doença de Chagas

Resumo

As doenças que se encaixam na classe das doenças negligenciadas geralmente afetam a população de baixa renda e países com baixa infraestrutura, já os tratamentos são reduzidos e de elevada complexidade. As barreiras no tratamento da doença de chagas envolvem limitações no número de fármacos disponíveis, sendo o BNZ o único disponível no Brasil e disponibilizado pelo SUS. Além do difícil diagnóstico nas fases iniciais (aguda), o tratamento com BNZ tem baixa eficácia na fase crônica e acarreta em diversos efeitos colaterais levando ao abandono do mesmo. A confecção de uma fórmula farmacêutica de liberação transbucal em alternativa a convencional (uso oral), pode reduzir os efeitos colaterais causados no sistema gástrico. O objetivo é produzir filmes muco adesivos de quitosana incorporados com BNZ, BNZ:GML e BNZ:LA para uma administração transbucal, de baixo custo. Devido a elevada taxa de cristalização do BNZ foi necessário desenvolver um método de preparo para os filmes, baseado na utilização de acetona e agitação simples sob aquecimento (80°C) durante 10 minutos. A utilização do GML como compatibilizante apresentou um aumento no desempenho dos filmes, devido as ligações de hidrogênio com a quitosana (QTS) e o BNZ, e também nas interações com a mucosa. Os filmes se apresentam como matrizes maleáveis, de coloração esbranquiçada e mantiveram as características mucoadesivas originárias da quitosana. Os resultados de permeabilidade para os filmes compostos de QBL150 (QTS/BNZ 150 mg/GML 150 mg) mostram-se promissores, devido ao elevado coeficiente de permeabilidade quando comparados com as soluções controle e os filmes QB150 e QBLA150 (QTS/BNZ 150 mg/LA 150 mg). Os resultados de permeabilidade obtidos neste capítulo foram obtidos em parceria com o Laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos e cosméticos (LTMAC) no Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB) - DF

Palavra-chave: quitosana, benznidazol, filmes mucoadesivos, permeabilidade.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.5 Materiais

BNZ 99% fornecido pelo laboratório LAFEPE (Brazil), Glicerol monoestearato ($C_{17}H_{35}OCOCH_2CH(OH)CH_2OH$) purificado (Alfa Sesar), Glicerol monolaurato ($C_{15}H_{35}OCOCH_2CH(OH)CH_2OH$), ácido láurico ($CH_3(CH_2)_{10}COOH$) (Dinâmica). Quitosana de média massa molar ($MM \sim 106000$) com 86,8% de desacetilação (Sigma Aldrich) (Sanches *et al.*, 2020b). O tampão fosfato-salina (PBS) foi preparado com Na_2HPO_4 (1,43 g L^{-1}), KH_2PO_4 (0,24 g L^{-1}), NaCl (8,00 g L^{-1}), KCl (0,20 g L^{-1}) e teve seu pH ajustado para 7,4 com HCl 1 mol L^{-1} . O tampão HEPES pH 7,4. Tampão saliva (com adaptações) preparado com KCl (1,5 g L^{-1}), $NaHCO_3$ (0,5 g L^{-1}), Na_2HPO_4 (0,5 g L^{-1}) e KSCN (0,5 g L^{-1}) pH 6,8 (Musa Trolic *et al.*, 2019). Os demais reagentes serão adquiridos ou sintetizados durante o decorrer dos experimentos. Os solventes serão utilizados com alto grau de pureza.

5.2.6 Métodos

5.2.6.1 Preparo dos filmes de quitosana contendo BZN

As matrizes poliméricas de quitosana (filmes) enriquecidas com BNZ foram produzidas utilizando a técnica de secagem por evaporação de solvente (*casting*). Os filmes foram produzidos a partir de metodologia descrita por Enumo *et al.*, (2020), com algumas considerações. A partir de uma solução de quitosana 1% (m/v) (60 mL) dissolvida em ácido acético 1% (v/v) e mantida sob aquecimento a 80°C para a incorporação do BNZ sob processo de agitação. O BNZ e/ou BNZ/MGs foi incorporado na matriz de quitosana gotejando-se (4,66 mL min^{-1}) uma solução do ativo dissolvido em acetona (suficiente para dissolver a massa de BNZ e/ou BNZ/MGs). Inicialmente foram comparados os processos de agitação por ultraagitação *turrax* (14000 rpm) (Figura 21a) e agitador mecânico (com pás de agitação) (400 rpm) (Figura 21b). Cabe ressaltar que, para melhor entendimento do efeito da presença do GML nas matrizes, foram também desenvolvidos filmes de quitosana com ácido láurico.

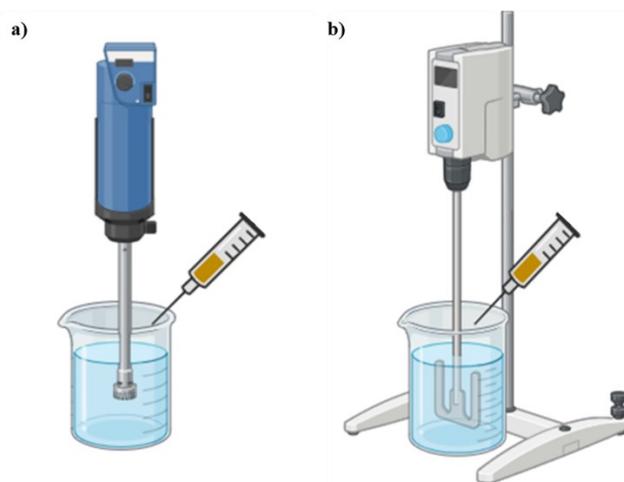


Figura 20. Imagens dos agitadores utilizados, com o respectivo aumento de cada haste a) agitação por ultraagitação *turrax* e b) agitação mecânica por pás

Para melhor visualização do processo de preparação dos filmes e das características das matrizes geradas, foi realizado posteriormente a variação de massa de BNZ, BNZ/GML e BNZ/LA, assim como GML e LA, nas soluções filmogênicas, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Sumarização das amostras produzidas e seus constituintes.

Amostra	Solução de quitosana 1% (mL) / Massa de quitosana (mg)	Massa de cada componente			Método de agitação
		BNZ (mg)	GML (mg)	LA (mg)	
BNZT *	60 / 600	250	-	-	Turrax
BNZT	60 / 600	250	-	-	Turrax
BNZP	60 / 600	250	-	-	Pás
QTS	60 / 600	-	-	-	Pás
QL50	60 / 600	-	50	-	Pás
QL150	60 / 600	-	150	-	Pás
QL250	60 / 600	-	250	-	Pás
QLA50	60 / 600	-	-	50	Pás
QLA150	60 / 600	-	-	150	Pás
QLA250	60 / 600	-	-	250	Pás
QB50	60 / 600	50	-	-	Pás
QB150	60 / 600	150	-	-	Pás
QB250	60 / 600	250	-	-	Pás
QBL50	60 / 600	50	50	-	Pás
QBL150	60 / 600	150	150	-	Pás
QBL250	60 / 600	250	250	-	Pás
QBLA50	60 / 600	50	-	50	Pás
QBLA150	60 / 600	150	-	150	Pás
QBLA250	60 / 600	250	-	250	Pás

* Adição do BNZ como recebido, sem dissolução prévia em acetona.

Após o preparo das soluções filmogênicas estas soluções foram transferidas a placas de polietileno, deixadas secar por 72h em estufa a uma temperatura de 30 °C, até a completa saída do solvente. Os filmes foram retirados das placas e acondicionados em dessecador para posterior caracterização.

5.2.6.2 *Imagens macroscópicas dos filmes*

As imagens dos filmes para caracterização macroscópicas foram adquiridas em uma cabine de luz com um celular Samsung s22 modelo SM-S901E, utilizando a câmera nas configurações de ISO: 100, velocidade do diafragma: 1/750 e balanço de temperatura: 4000K.

5.2.6.3 *Microscópio óptica com luz polarizada (PLOM)*

As imagens de PLOM foram obtidas em um microscópio óptico Moitec (Vancouver, Canada), com os filtros polarizadores na posição 0° e 90°. As imagens foram adquiridas utilizando um celular Samsung S22 modelo SM-S901E acoplado a objetiva do microscópio, nas configurações de ISO: 800, velocidade do obturador: 1/1000.

5.2.6.4 *Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos em um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu (Kyoto, Japan) utilizando pastilhas de KBr para os materiais de partida (4000 - 400 cm^{-1}) e refletância total atenuada (ATR) para todas os filmes preparados (4000 - 750 cm^{-1}). A resolução foi de 2 cm^{-1} , com um total de 25 aquisições.

5.2.6.5 *Calorimetria diferencial de varredura (DSC)*

Os termogramas para os filmes foram obtidos em um calorímetro diferencial de varredura TA Instruments Q200 calorimeter (New Castle, USA). As medidas foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio (50 mL^{-1}), utilizando cadinhos de alumínio. A análise do LA foi performada nos mesmos parâmetros citadas na seção 2.2.3. Para os filmes de quitosana, as amostras foram analisadas em duas corridas de modo a apagar a história térmica. A primeira corrida, 5-10 mg dos filmes foram submetidos a uma corrida isotérmica de 25 a 110 °C por 3 min a uma taxa de 10 °C min^{-1} com um resfriamento rápido em nitrogênio líquido, a fim de apagar a história térmica do polímero e diminuir o

teor de água. Após este tratamento, a amostra foi submetida a uma segunda corrida que foi de 0 a 300 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de modo a observar os principais eventos térmicos do material.

5.2.6.6 *Microscopia eletrônica de varredura (SEM)*

As micrografias das superfícies de secagem e de criofraturas de todas as amostras de filmes desenvolvidas no estudo foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6701F (MEV-FEG) (LCME - UFSC), com o intuito de analisar a morfologia dos filmes, superfície superior e inferior e transversal. As amostras foram posicionadas sobre *stubs* com auxílio de fitas dupla face de carbono, metalizadas com uma fina camada de ouro e analisadas entre 8 a 10 kV em diferentes magnificâncias.

5.2.6.7 *Difração de raios-X (DRX)*

A presença de domínios cristalinos do BNZ nos filmes, após o processo secagem, foi determinada através da técnica de difração de raios-X para os filmes. Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro Philips X'Pert 52 (Holanda), com radiação de cobre K α ($k = 1,5418 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV e corrente de operação de 30 mA. Todos os ensaios serão realizados com 2θ entre 2° e 50° e passo de 0,05 ° s⁻¹.

5.2.6.8 *Ângulo de contato*

As medidas do ângulo de contato das membranas foram efetuadas ao colocar uma pequena gota de água (~3 μL) sobre a superfície do material usando uma seringa. As imagens foram registradas utilizando a câmera do goniômetro (modelo 250-F1 da Ramé-Hart Inst. Co) e o ângulo determinado automaticamente pelo *software DropImage* (versão 3.54). Foram conduzidas 10 medições a cada intervalo de 1 segundo de exposição, em triplicata.

5.2.6.9 *Estudo de mucoadesão estática in vitro*

O teste de mucoadesão foi performedo de acordo com o método descrito por GRATIERI et al. (2010), com algumas modificações (Gratieri *et al.*, 2010). As pastilhas de mucina com diâmetro aproximado de 9 mm foram preparadas utilizando 250 mg de mucina, umedecidas com 50 μL de uma solução de mucina (8% w/v). O ensaio foi realizado em um texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems) em modo de força de

compressão. Os discos de mucina eram posicionados na extremidade inferior de uma sonda cilíndrica e a amostra posicionada entre um suporte de acrílico, preso a base do texturômetro, permitindo uma área de contato de 9 mm. Em seguida, a sonda cilíndrica com o disco de mucina, foi abaixada até entrar em contato com a superfície da amostra. Uma força descendente de 0,2 N foi aplicada por 30 segundos para garantir o contato entre o disco de mucina e a amostra. A sonda foi então movida para cima a uma velocidade constante de 0,1 mm/s, e a força necessária para separar o disco de mucina da superfície de cada formulação foi determinada a partir do gráfico força-tempo resultante. O software do equipamento Texture Exponent Lite registrou a força necessária para remoção, obtendo um gráfico de força versus tempo. Todas as medições foram realizadas em triplicata. [94]

5.2.6.10 Estudo de permeabilidade do BNZ *ex vivo* em mucosa suína

Os estudos de permeabilidade foram realizados em mucosa bucal suína, a fim de observar o comportamento e estimar a viabilidade dos filmes gerados (Kulkarni *et al.*, 2009). A mucosa bucal suína foi obtida em um abatedouro local imediatamente após o abate e transportada em tampão HEPES pH 7,4. Para os testes, o tecido adiposo foi removido com o auxílio de tesoura cirúrgica e bisturi para obter a mucosa. Os ensaios de permeabilidade foram realizados utilizando um Sistema de Teste de Difusão Phoenix DB-6 modelo Hanson's DB-6. A câmara de difusão de Franz (Figura 22) é composta de uma câmara doadora (1 mL de volume total e 13 mm de diâmetro) e uma câmara receptora (15 mL de volume total composto de uma solução de PBS/Polipropileno glicol 50% e agitação magnética de 300 rpm). (Amaral *et al.*, 2021b)

Para a amostra controle, 1 mL de uma solução de BNZ (2,5 mg L⁻¹ dissolvido em propileno glicol) foi colocada na câmara doadora, acima da mucosa (Amaral *et al.*, 2021a). Já os filmes poliméricos com BNZ: QBNZ150, QBL150 e QBLA150 foram cortadas em formato de disco com 14,5 mm de diâmetro, resultando em 2,5 mg de BNZ por amostra. Os filmes foram posicionados acima da mucosa, umedecidos com 100 µL de tampão saliva simulado, e foi utilizado um aparato para auxiliar a adesão do mesmo a mucosa após sua expansão recorrente ao entumescimento.

O ensaio foi conduzido a 37 °C em um período de 8 h com coletas de 0,5 mL de hora em hora da câmara receptora (volumes iguais de meio eram repostos a cada coleta).

As alíquotas foram dissolvidas em 1 mL de acetonitrila, centrifugadas por 10 min a 1500 rpm e posteriormente injetadas no HPLC seguindo o método supracitado no capítulo III.

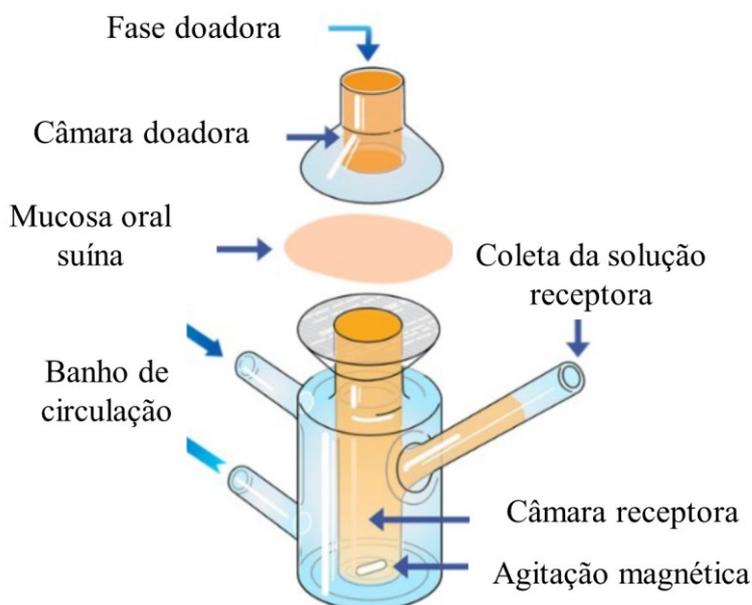


Figura 21 - Representação esquemática da câmara de difusão de Franz. Adaptado de (Franz, 1975)

5.2.6.10.1 Cálculos dos dados de permeabilidade

A quantidade de fármaco acumulada por área (Q_t) será calculada de acordo com a Equação 7 (Sintov; Botner, 2006).

$$Q_t = V_r C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s C_i \quad \text{Equação 7}$$

Onde V_r e V_s representam o volume da solução receptora e da alíquota, respectivamente; C_t é a concentração de fármaco no meio receptor em cada tempo de amostragem e C_i é a concentração de fármaco no tempo de ordem i .

Através dos dados obtidos pela permeabilidade será calculado o estado de fluxo constante (J_s) através do coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade permeada acumulada de fármaco ($\mu\text{g cm}^{-2}$) em função do tempo (h). O coeficiente de permeabilidade (P) será determinado pela relação entre J_s e a concentração inicial de fármaco na câmara doadora ($P = J_s/C_d$). O tempo de latência, tempo requerido para a obtenção do estado de fluxo constante, é representado pelo intercepto da regressão linear com o eixo das abcissas.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.5.1 Seleção da metodologia de preparo dos filmes de quitosana

Para a incorporação e compatibilização do BNZ na matriz de quitosana (QTS) foram realizados alguns estudos preliminares para definição de parâmetros e avaliação de possíveis interferências. As análises de SEM, PLOM e DSC foram selecionadas para auxiliar na escolha das melhores condições de preparo dos filmes contendo BNZ, no que se refere a melhor dispersão na matriz polimérica e diminuição de sua cristalinidade nos filmes. Foram comparados dois métodos de agitação (Figura 21), um de maior energia, utilizando *ultra turrax* com a adição do BNZ sem dissolver em acetona (BNZT*) e dissolvido em acetona (BNZT), e outro método de baixa energia, utilizando pás (BNZP). A Figura 23 mostra, de uma forma geral, as principais características morfológicas dos filmes obtidos após o uso das duas metodologias de agitação, e a utilização ou não da acetona no preparo dos filmes.

A Figura 23a mostra que a adição do BNZ como recebido, sem nenhum tratamento prévio, resultou em uma incorporação insuficiente e uma distribuição heterogênea, observado tanto na superfície quanto na seção transversal (Figura 23c). Os filmes formulados com a solubilização prévia do BNZ em acetona, mostram uma distribuição homogênea dos cristais, como observado nas Figuras 23d, e, f, g, h, e i. A adição lenta da solução de acetona por gotejamento na solução filmogênica de quitosana aquecida, sob agitação, proporcionou uma remoção parcial de acetona durante o processo, permitindo que os cristais de BNZ se distribuam de uma forma mais homogênea na matriz polimérica.

Comparando apenas os processos de agitação não foi possível observar nenhuma distinção, em ambos os filmes é observada a presença de uma grande quantidade de BNZ cristalino disperso. MELO et al (2016) descreve a presença de cristais de BNZ no formato de agulhas na superfície de micropartículas confeccionadas com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), HP- β -CD mais trietanolamina (TEA) e HP- β -CD mais 1-metil-2-pirolidona (NMP) e secas utilizando a técnica de *spray drying* (de Melo *et al.*, 2016b).

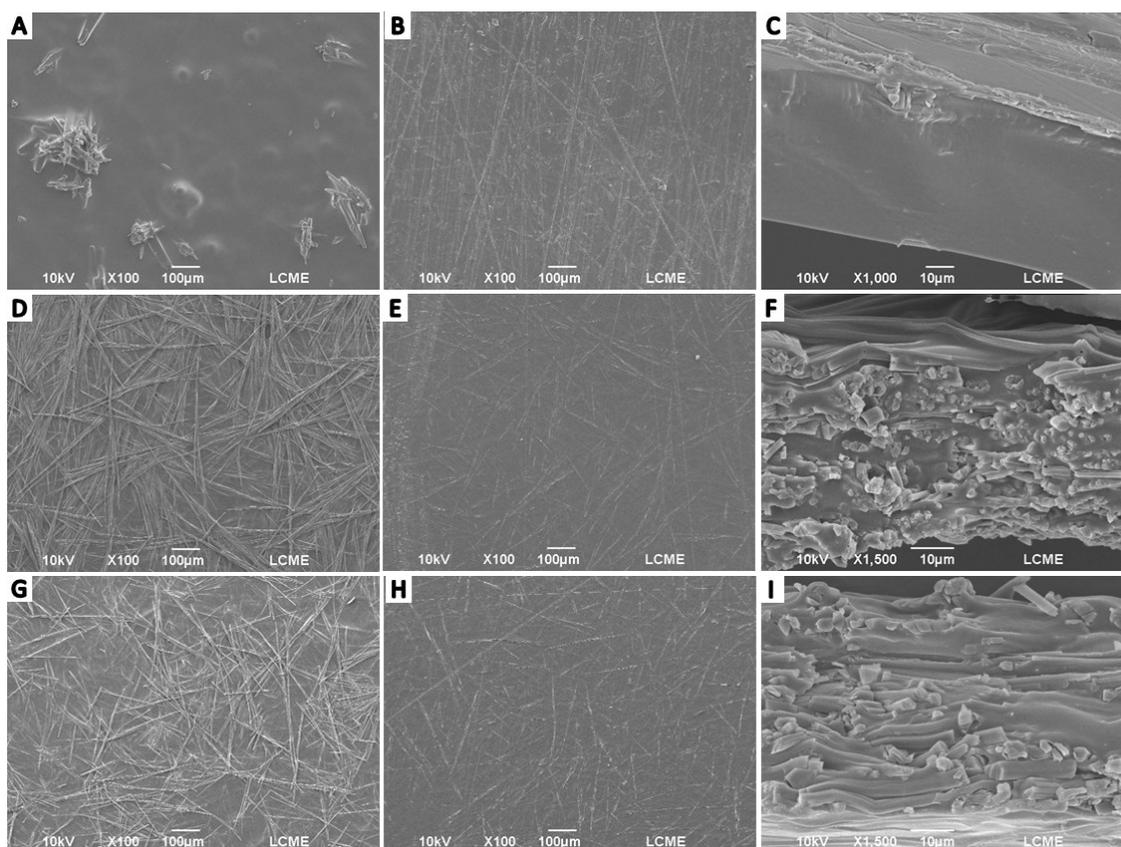


Figura 22. Imagens de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes preparados via agitação com *ultra turrax*: sem a dissolução do BNZ em acetona (BNZT*) (a, b, c) e com a dissolução em acetona (BNZT) (d, e, f) e agitação utilizando pás (BNZP) (g, h, i).

As imagens de microscopia óptica com e sem luz polarizada (Figura 24) evidenciam as informações já obtidas pelas análises de SEM, reafirmando a necessidade da solubilização prévia do BNZ em acetona. Para a amostra BNZT* observa-se regiões ricas em BNZ na forma de pó branco (Figura 24a), característico do fármaco como recebido, e para a amostra BNZT e BNZP, é visível uma maior dispersão dos cristais na matriz polimérica. A adição de acetona a solução de quitosana pode levar a precipitação da mesma, pois o solvente é comumente descrito em processos de extração de quitina e quitosana para a lavagem do precipitado, fazendo-se necessário avaliar os efeitos da adição do solvente no preparo dos filmes (Namboodiri; Pakshirajan, 2020). Para este fim, foram preparados três filmes de quitosana pura, sem a adição de fármaco ou aditivos: i) solução filmogênica seca sem nenhum tratamento, ii) solução filmogênica seca após ser aquecida até 80°C por 15 minutos e iii) solução filmogênica seca após ser aquecida até 80°C por 15 minutos com adição de acetona (10 mL). Para esta etapa foi selecionado a técnica de calorimetria diferencial, para avaliar a ocorrência de variações na temperatura

de transição vítrea e o perfil dos eventos térmicos, já que estes dados são indicativos de alterações na estrutura do polímero e formação de ligações cruzadas.

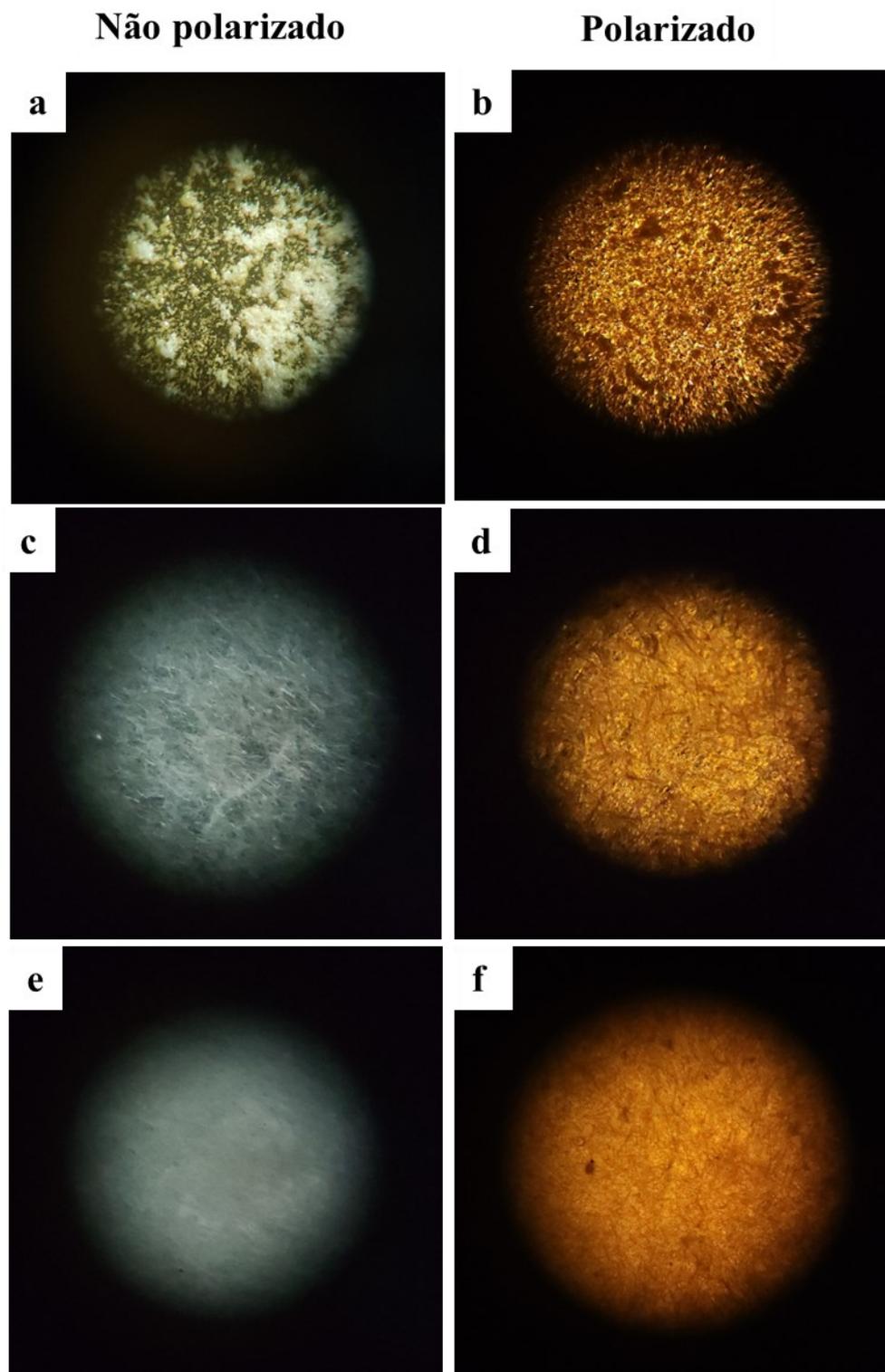


Figura 23. Imagens de microscopia óptica para os filmes BNZT* (a, b), BNZT (c, d) e BNZP (e, f) sem luz polarizada (esquerda) e com luz polarizada (direita).

A (Figura 25a) mostram que os filmes de quitosana pura (QTS) obtidos pelos diferentes métodos de preparo, não apresentaram variações na transição vítrea em torno de 168 °C. É observada apenas uma sutil diferença no perfil térmico para a amostra que não foi submetida ao aquecimento, na região entre 0 e 150 °C, indicando uma maior quantidade de água no filme ou retenção de solvente. Os dados apontam que a utilização de acetona, assim como o aumento da temperatura, não afetou a integridade dos filmes de quitosana. A utilização de acetona e do aumento da temperatura no processo é de fundamental importância para que ocorra uma mistura homogênea do BNZ entre todos os outros componentes. A adição do BNZ em pó resulta em uma mistura heterogênea com domínios ricos em BNZ.

A energia necessária para a homogeneização da mistura também foi levada em consideração, sendo comparados dois diferentes aparatos de agitação mecânica: turrax (BNZT) e pás (BNZP). Ambos os métodos levaram a uma diminuição da temperatura de fusão do BNZ, sendo mais significativo para a agitação com pás, mostrando a existência de eventos térmicos, iniciando em 135 °C, contendo dois eventos de fusão em 176 e 181 °C (Figura 25b). A curva de DSC para a amostra BNZT* não foi realizada devido a não homogeneidade do filme, observada nas micrografias acima.

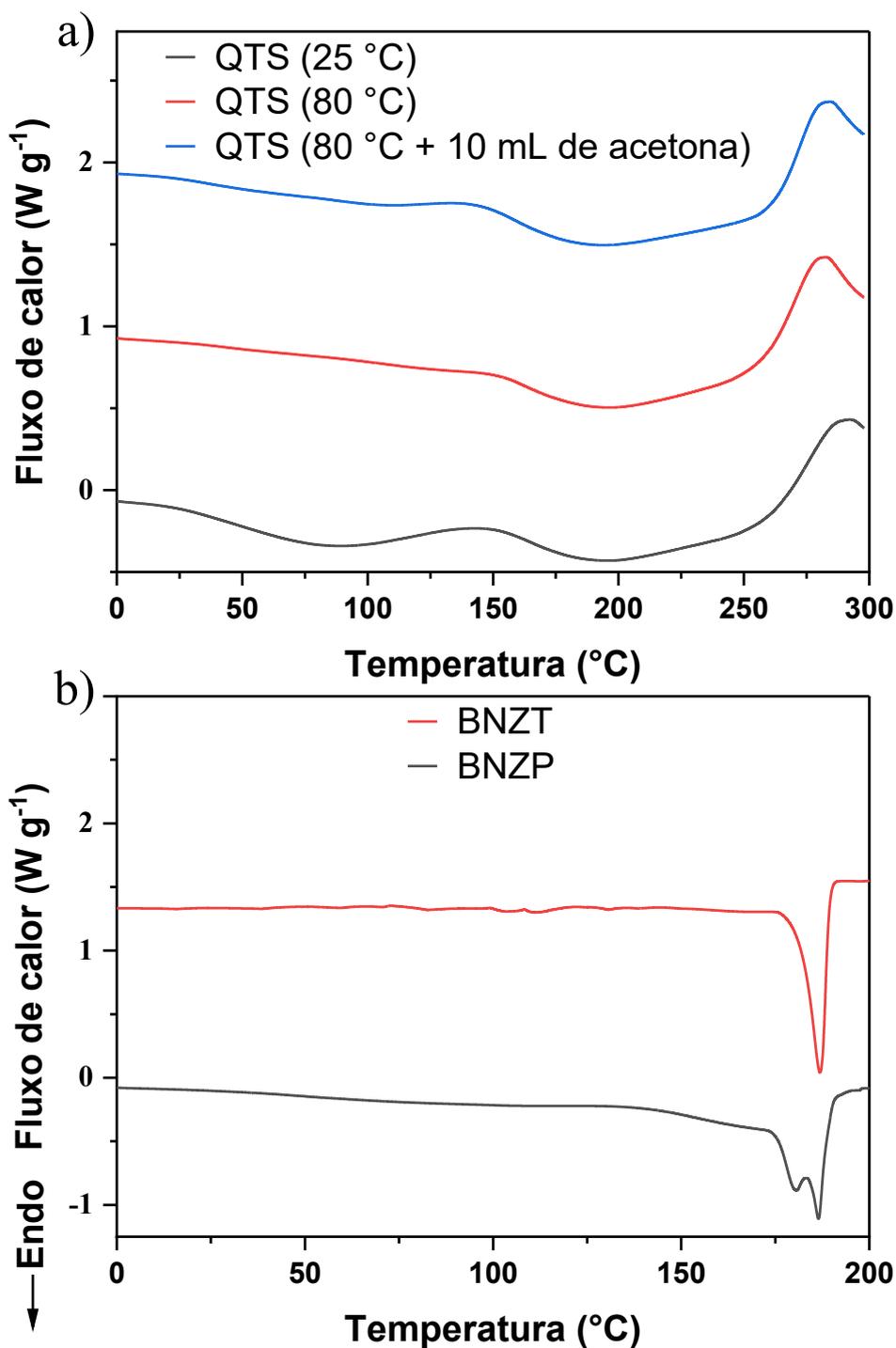


Figura 24. DSC para os filmes de quitosana e quitosana com BNZ

Após a análise dos dados obtidos pelas análises apresentadas anteriormente, optou-se pela metodologia de preparo dos filmes realizadas através da dissolução prévia dos componentes em acetona (10 mL). A escolha da acetona é baseada na elevada solubilidade do BNZ neste solvente, assim como do GML e LA, podendo assim ser

realizada lentamente por gotejamento. A adição de acetona em excesso na solução de quitosana pode levar a precipitação da quitosana, diminuindo assim a homogeneidade dos sistemas formados e por este motivo foi utilizada a temperatura (80 °C) durante a agitação como uma alternativa para reduzir a quantidade da mesma em solução. A rápida remoção de solvente antes da secagem em estufa também é de suma importância para evitar a formação de grandes estruturas cristalinas, possibilitando que a energia fornecida pela agitação promova a dispersão do BNZ na matriz. A evaporação lenta da acetona poderia levar a formação de uma grande quantidade de cristais na superfície dos filmes. A hipótese está baseada na metodologia de formação de nanoemulsões (o/w) pelo método espontâneo, a migração da acetona para a fase aquosa permite a formação de gotículas oleosas na fase aquosa que são rapidamente estabilizadas por uma segunda molécula (Saatkamp *et al.*, 2023b). Porém neste sentido foi objetivado que as pequenas frações de cristais formados durante o processo de evaporação da acetona fossem rapidamente incorporados pela QTS.

A partir das condições experimentais de preparo definidas, foram então preparados os filmes de quitosana contendo BNZ em três diferentes composições: i) filmes de quitosana com BNZ; ii) filmes de quitosana com BNZ na presença de GML e iii) filmes de quitosana com BNZ na presença de LA, nomeados de QB, QBL e QBLA, respectivamente (Tabela 10). As massas de cada ativo utilizados em cada formulação estão resumidas na Tabela 10. Para os filmes QB foram adicionadas três diferentes massas de BNZ (50, 150 e 250 mg), já para os filmes QBL e QBLA foram utilizadas as mesmas massas de BNZ, juntamente com os aditivos GML e LA na proporção de 1:1 de BNZ/GML ou LA. A proporção de fármaco com cada aditivo é resultado das conclusões obtidas no capítulo II.

5.5.2 Análises macro e microscópicas dos filmes de quitosana com BNZ, GML e LA

Após a definição dos parâmetros experimentais para o preparo dos filmes poliméricos, foram obtidos um total de 15 filmes com diferentes concentrações de GML, LA, BNZ, BNZ/GML e BNZ/LA, conforme listado na Tabela 10. Inicialmente foram preparados filmes sem a adição de BNZ, somente com os aditivos GML e LA, a fim de avaliar o comportamento e os efeitos da sua adição.

A Figura 26 mostra que a adição de GML ou LA resulta em membranas heterogêneas, com domínios ricos em um único componente. Aparentemente a interação entre QTS e GML mostrou-se superior, em virtude da existência de possíveis interações por ligação de hidrogênio, mostrando a importância da presença do grupo glicérol presente na estrutura do GML nos filmes. Para os filmes contendo ácido láurico evidencia-se que se orientam em domínios cristalinos pela extensão da amostra analisada, localizados principalmente na superfície dos filmes obtidos com a sua adição. A presença dos domínios cristalinos na superfície do filme aumenta com a quantidade de LA adicionada (Figuras 26e, f, g).

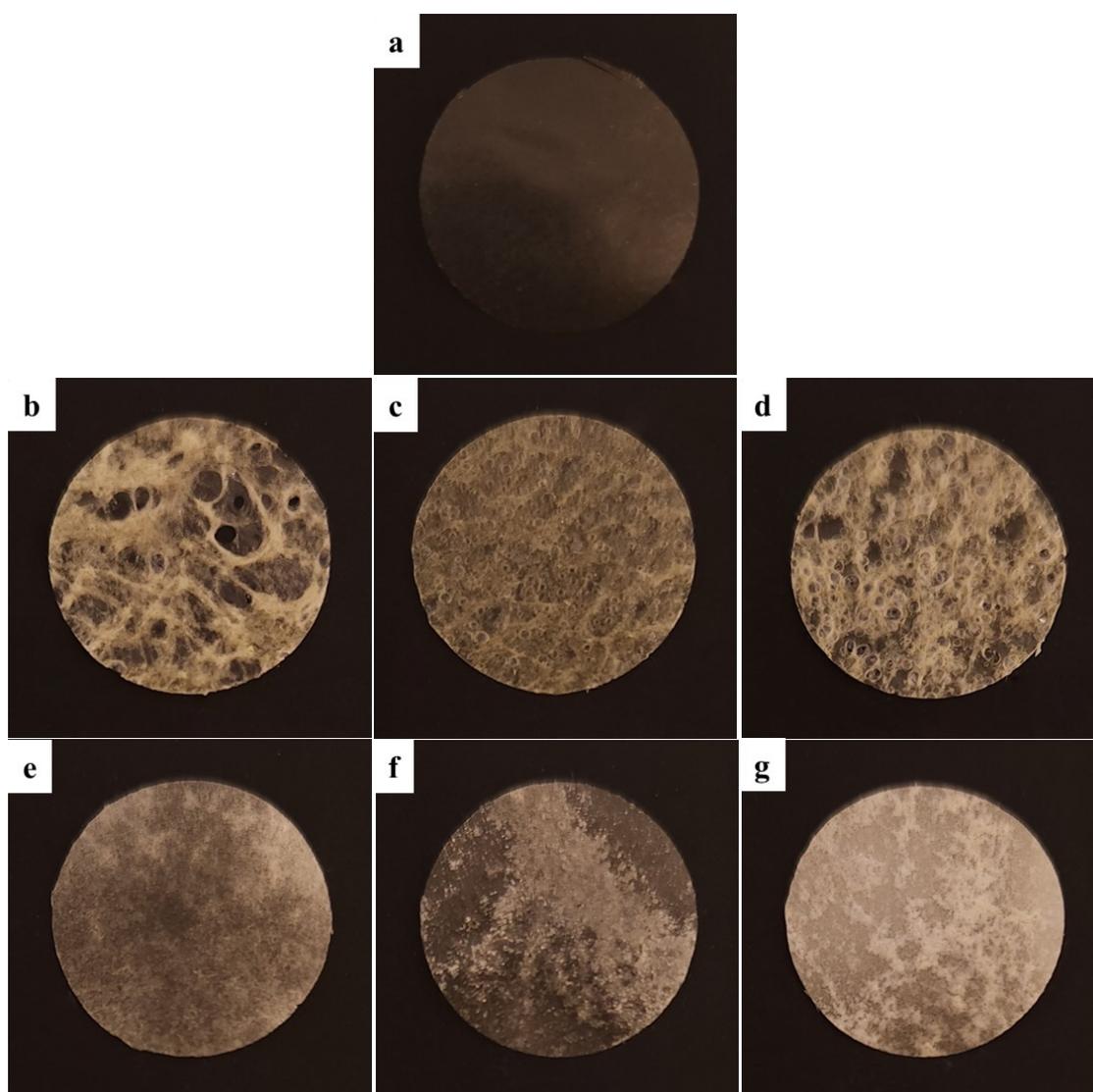


Figura 25. Imagens macroscópicas para os filmes sem BNZ: QTS (a), QL50 (b), QL150 (c), QL250 (d), QLA50 (e), QBLA150 (f) e QLA250 (g).

O potencial de emulsificação do GML também é visível nos filmes, através das bolhas presentes após a secagem e do aumento significativo da espessura, quando

comparado com os filmes QLA. A Tabela 11 também mostra um aumento da espessura para os filmes QLA ($\geq 0,098$), devido ao acréscimo de massa na formulação final, porém é menos expressiva para os filmes QL ($\geq 0,19$), corroborando com a baixa interação entre o LA e a quitosana.

Tabela 11. Espessura dos filmes poliméricos determinados por um micrometro em diferentes posições (n=5).

Filme	Espessura (mm)
QTS	0,047 ± 0,0055
QL50	0,15 ± 0,010
QL150	0,11 ± 0,0096
QL250	0,19 ± 0,022
QLA50	0,068 ± 0,0069
QLA150	0,098 ± 0,0057
QLA250	0,096 ± 0,0052
QB50	0,056 ± 0,0090
QB150	0,064 ± 0,0044
QB250	0,081 ± 0,0016
QBL50	0,065 ± 0,0063
QBL150	0,11 ± 0,012
QBL250	0,12 ± 0,011
QBLA50	0,073 ± 0,0095
QBLA150	0,085 ± 0,0085
QBLA250	0,11 ± 0,0089

Para todos os filmes evidenciam-se um aumento da espessura quando comparados com os filmes de quitosana pura (QTS), resultante da incorporação e solubilização de todos os componentes (Tabela 11). A adição do BNZ, assim como das misturas BL e BLA levaram a um crescimento proporcional da espessura com o aumento da quantidade dos fármacos. Como mencionado anteriormente, os componentes (excipientes) GML e LA não formaram filmes homogêneos ou com elevada compatibilidade. Porém a Figura 27 mostra que o BNZ, apesar de se apresentar na forma cristalina nos filmes, quando

adicionado os excipientes, ocorreu uma maior homogeneização dos filmes, indicando compatibilização entre os componentes.

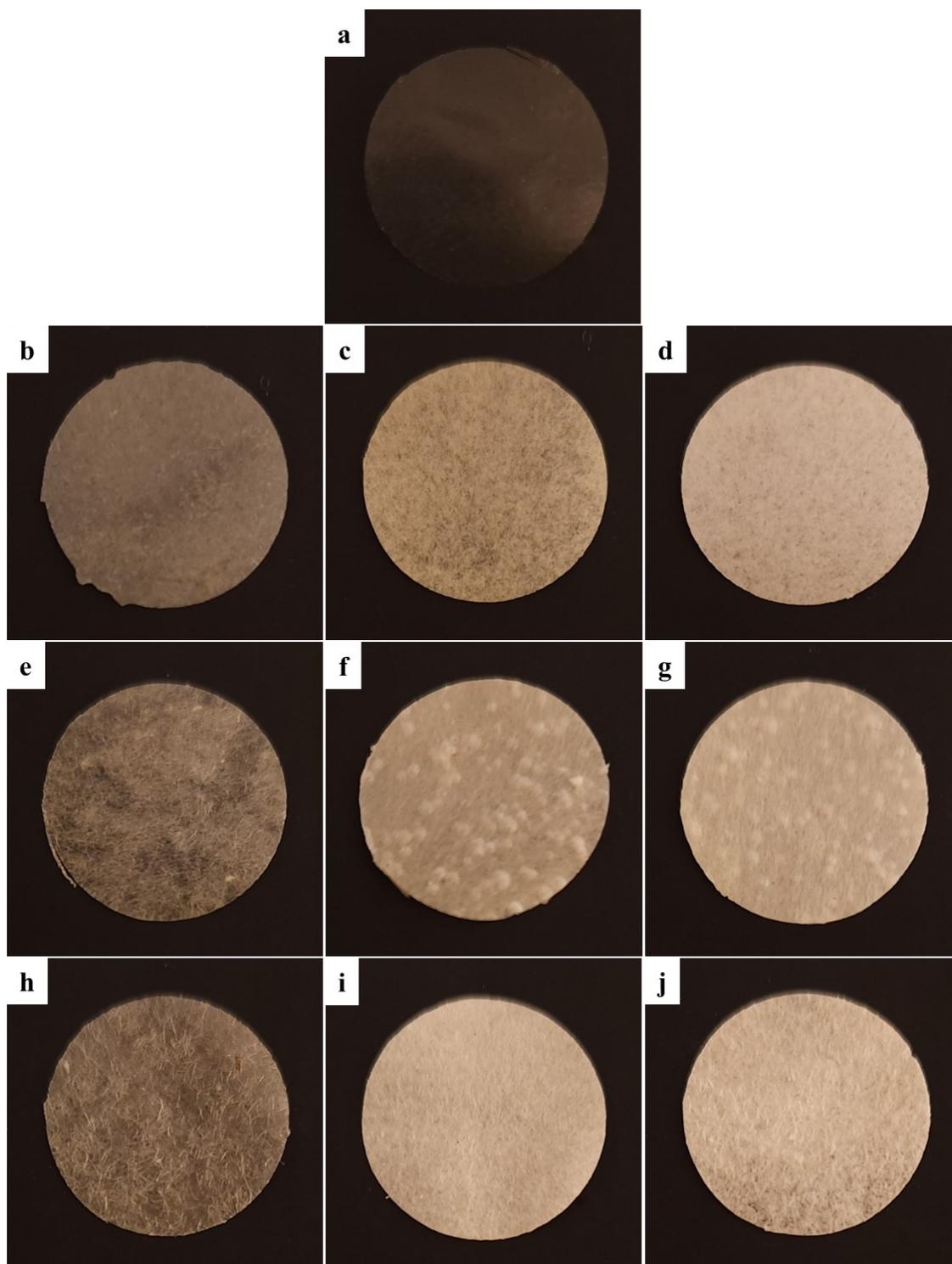


Figura 26. Imagens macroscópicas para os filmes QTS (a), QB50 (b), QB150 (c), QB250 (d), QBL50 (e), QBL150 (f), QB250 (g), QBLA50 (h), QBLA150 (i) e QBLA250 (j).

É notável o aumento dos domínios cristalinos com o aumento da quantidade de fármaco, assim como a espessura já mencionada. A ordem de grandeza do desvio padrão

da espessura indica homogeneidade em todo o perímetro do filme, possibilitando a realização do cálculo de concentração de ativo em mg cm^{-2} . As três diferentes concentrações de ativo BNZ são de: 0,53, 1,59 e 2,66 mg cm^{-2} . Para as amostras i) QB50, QBL50 e QBLA50, ii) QB150, QBL150 e QBLA150 e iii) QB250, QBL250 e QBLA250, respectivamente.

As imagens de microscopia óptica com luz polarizada para os filmes contendo BNZ, foram realizadas apenas para as amostras QB150, QBL150 e QBLA150 (Figura 28). É possível observar uma grande quantidade de cristais em ambas as amostras e diferentes densidades, tanto para os filtros em paralelo quanto cruzados.

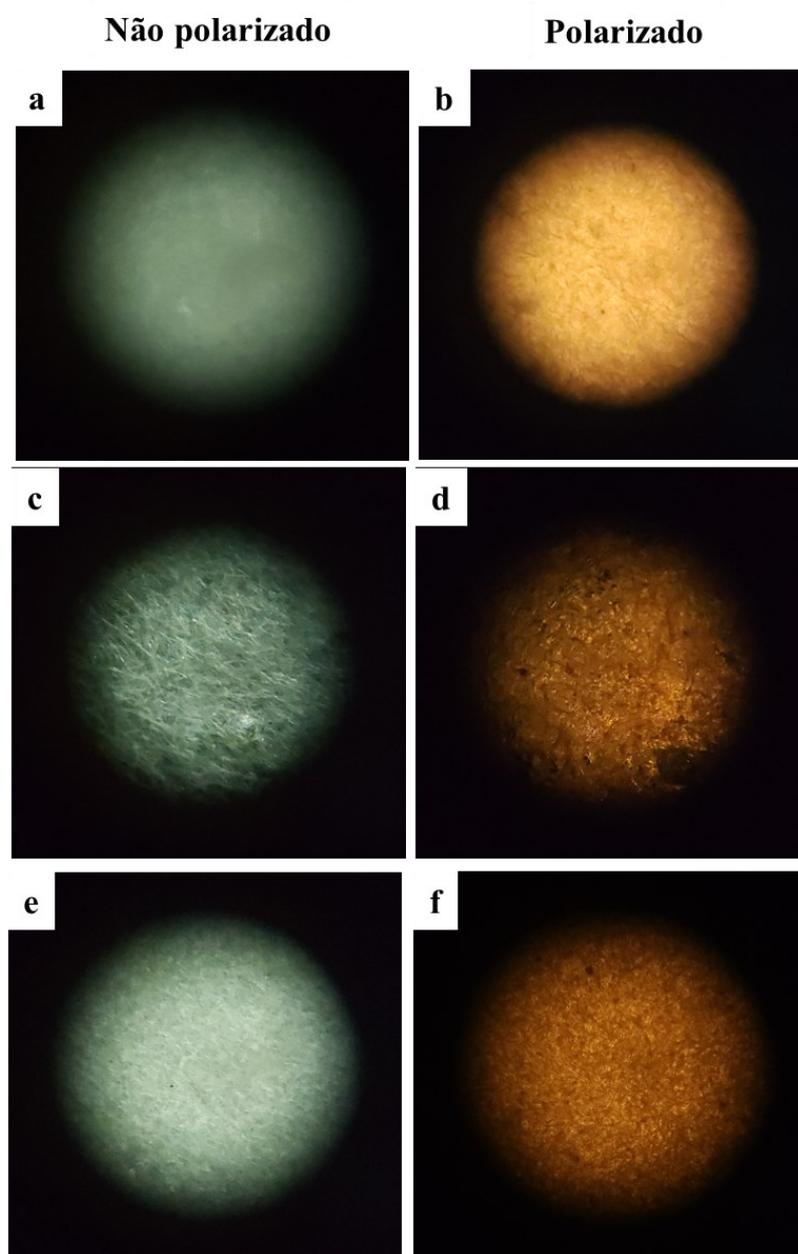


Figura 27. Imagens de microscopia óptica sem (esquerda) e com luz polarizada (direita) para os filmes QB150 (a, b), QBL150 (c, d) e QBLA150 (e, f).

O filme QBL150 apresenta uma grande quantidade de cristais longilíneos e pouco empacotados, visto que a uma maior passagem de luz, comparado com os filmes QBL150 e QBLA150, que aparentam serem os mais densos, devido a uma grande quantidade de pequenos cristais longilíneos empacotados.

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As imagens de SEM das superfícies, frente e verso e secção transversal dos filmes foram obtidas para análise morfológica (Figura 29, 30 e 31). Todos os filmes apresentaram cristais obilongos de BNZ na parte inferior, com exceção dos filmes QLA50 e QLA150 (Figura 31). No entanto a superfície superior mostra o mesmo comportamento, porém os cristais não são observados nos filmes QBL (Figura 30) em nenhuma das concentrações, indicando maior interação entre os componentes o auxílio do GML na diminuição da cristalinidade do BNZ na matriz.

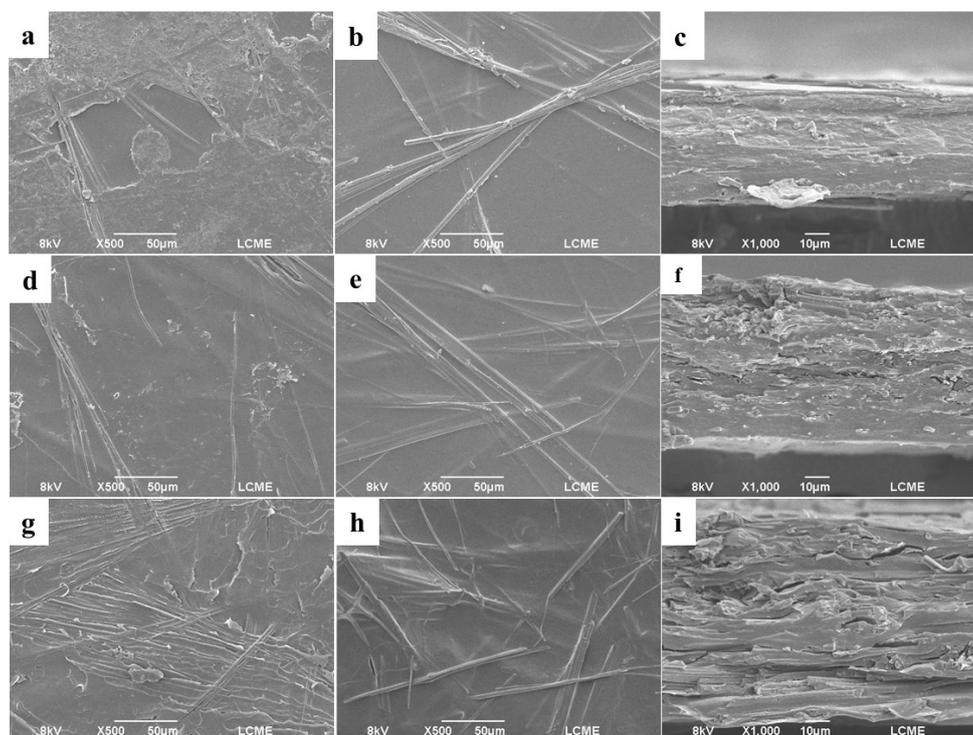


Figura 28. Images de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes QB50 (a, b, c), QB150 (d, e, f) e QB250 (g, h, i).

De modo geral todas as amostras apresentam uma superfície heterogênea com algumas irregularidades, devido aos cristais e também aos excipientes, ao contrário dos filmes de quitosana pura, que se apresentam homogêneos, tanto na superfície quanto na fratura (Anexo 8). Na fratura transversal, todos os filmes apresentaram cristais obilongos, cristais fraturados, assim como um aumento destes, com o incremento da concentração do BNZ.

Os resultados apresentados podem indicar uma baixa compatibilização devido a grande quantidade de cristais presentes nas micrografias, ou seja, os filmes após secos não teriam a capacidade de reduzir a cristalinidade do BNZ.

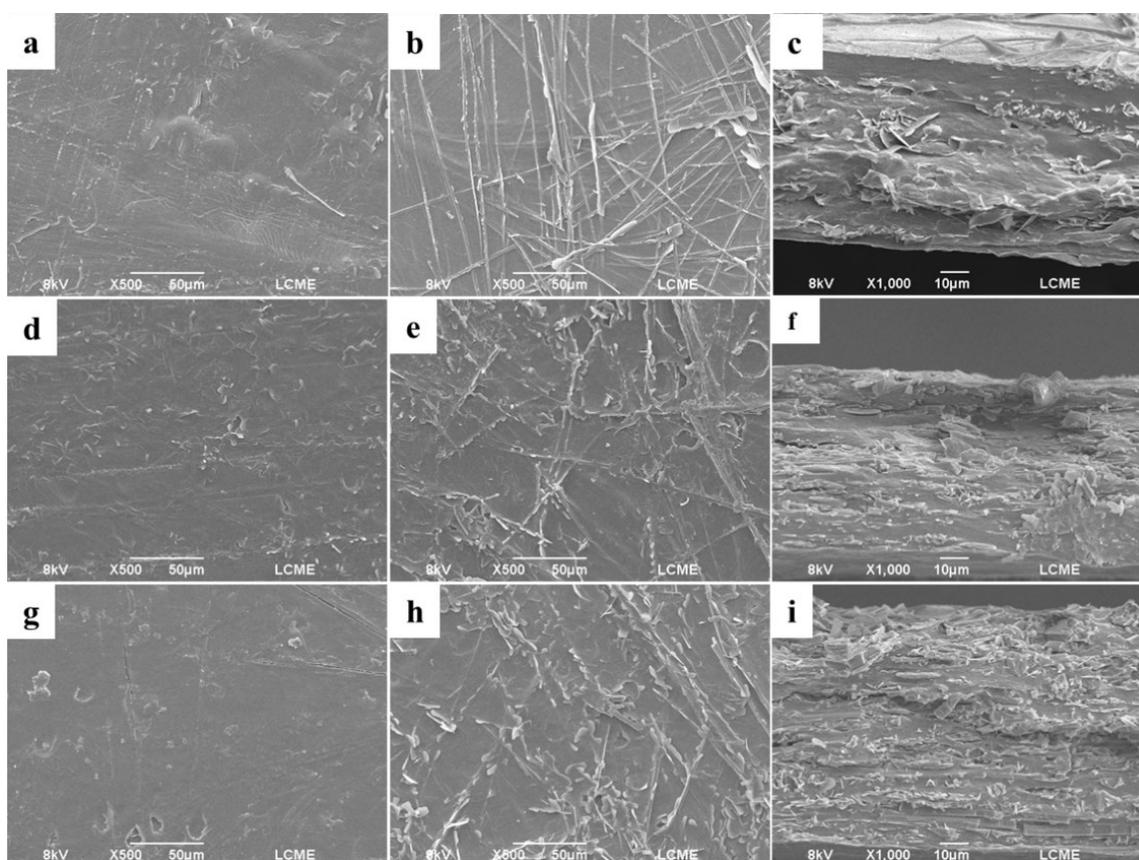


Figura 29. Images de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes QBL50 (a, b, c), QBL150 (d, e, f) e QBL250 (g, h, i).

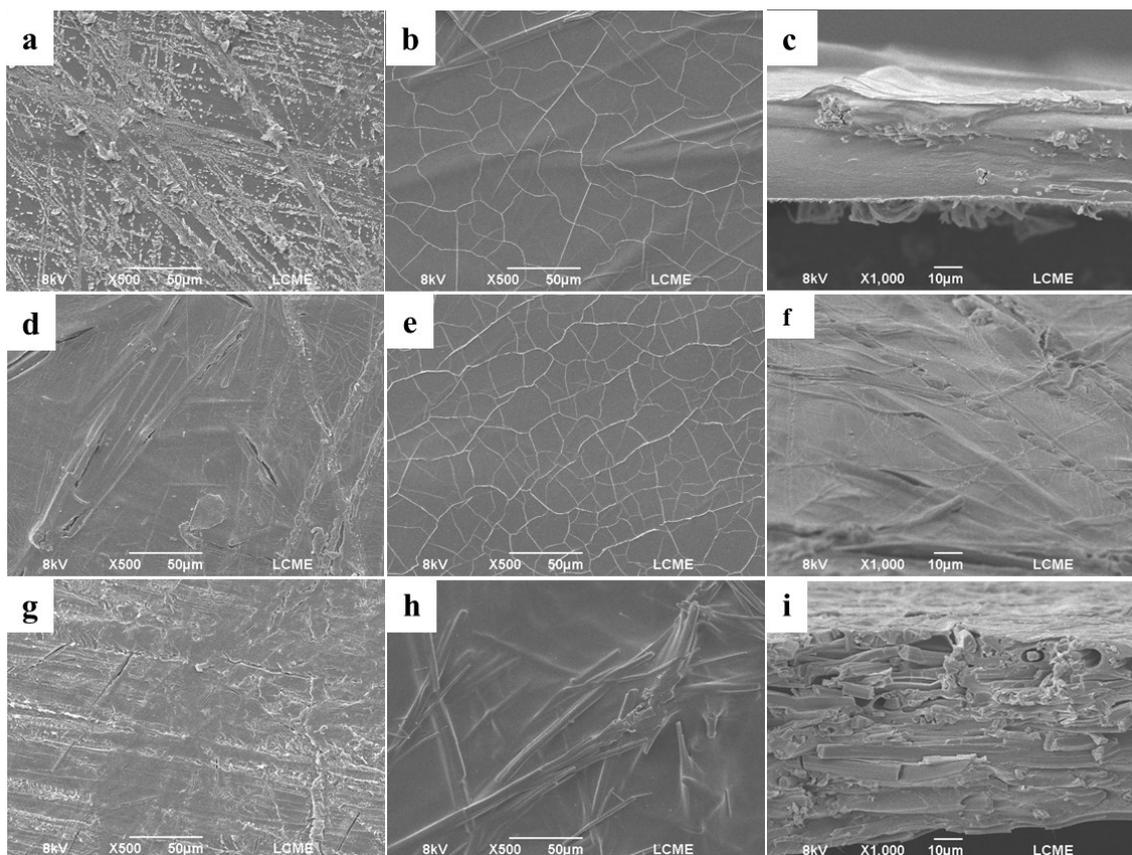


Figura 30. Imagens de superfície superior, inferior e fratura respectivamente, para os filmes QBLA50 (a, b, c), QBLA150 (d, e, f) e QBLA250 (g, h, i).

5.5.4 Molhabilidade por ângulo de contato

O ângulo de contato de uma gota de água na superfície dos filmes indica a capacidade do material em repelir a água. Ângulos de 90° ou maiores que 90° indicam uma maior hidrofobicidade e ângulos abaixo de 90° indicam que o material apresenta um caráter hidrofílico. O perfil de molhabilidade dos filmes está diretamente ligado com as características físico-químicas dos seus constituintes e da superfície do material, quanto maior a rugosidade, menor será o ângulo de contato. A Tabela 12 apresenta os valores de ângulo de contato calculados a partir da Imagem 32. A quitosana é um biopolímero com característica mucoadesiva e desta forma o ângulo de contato indica um perfil hidrofílico. A adição de LA levou a um aumento significativo da hidrofobicidade do filme ($24,26^\circ$), devido a longa cadeia hidrofóbica do ácido. Para o GML o aumento não foi tão significativo (10°), já que este possui a presença de um grupo hidrofílico.

Tabela 12. Valores de ângulo de contato para água sobre a superfície dos filmes.

Filme	Ângulo de contato \pm DP
QTS	49,12 \pm 0,72
QB50	72,42 \pm 0,09
QB150	86,18 \pm 0,03
QB250	81,00 \pm 0,05
QBL50	85,79 \pm 0,17
QBL150	59,72 \pm 0,42
QBL250	53,73 \pm 0,65
QBLA50	65,92 \pm 0,17
QBLA150	98,80 \pm 0,10
QBLA250	92,75 \pm 0,12
QL50	-
QL150	59,97 \pm 0,81
QL250	-
QLA50	-
QLA150	84,23 \pm 0,24
QLA250	-

DP = desvio padrão referente a n=3.

O BNZ, sendo uma molécula com elevada hidrofobicidade, também levou a um aumento considerável da hidrofobicidade dos filmes quando adicionado, porém os aumentos não são proporcionais. O aumento não proporcional é devido a uma elevação expressiva da rugosidade dos filmes acima de 150 mg de fármaco, gerando assim um menor ângulo de contato com a superfície. Como ambas as moléculas LA e BNZ levaram a um aumento de hidrofobicidade expressivo, juntas formaram os filmes com a maior hidrofobicidade, sendo um forte indicativo de um desempenho insuficiente no ensaio de permeabilidade.

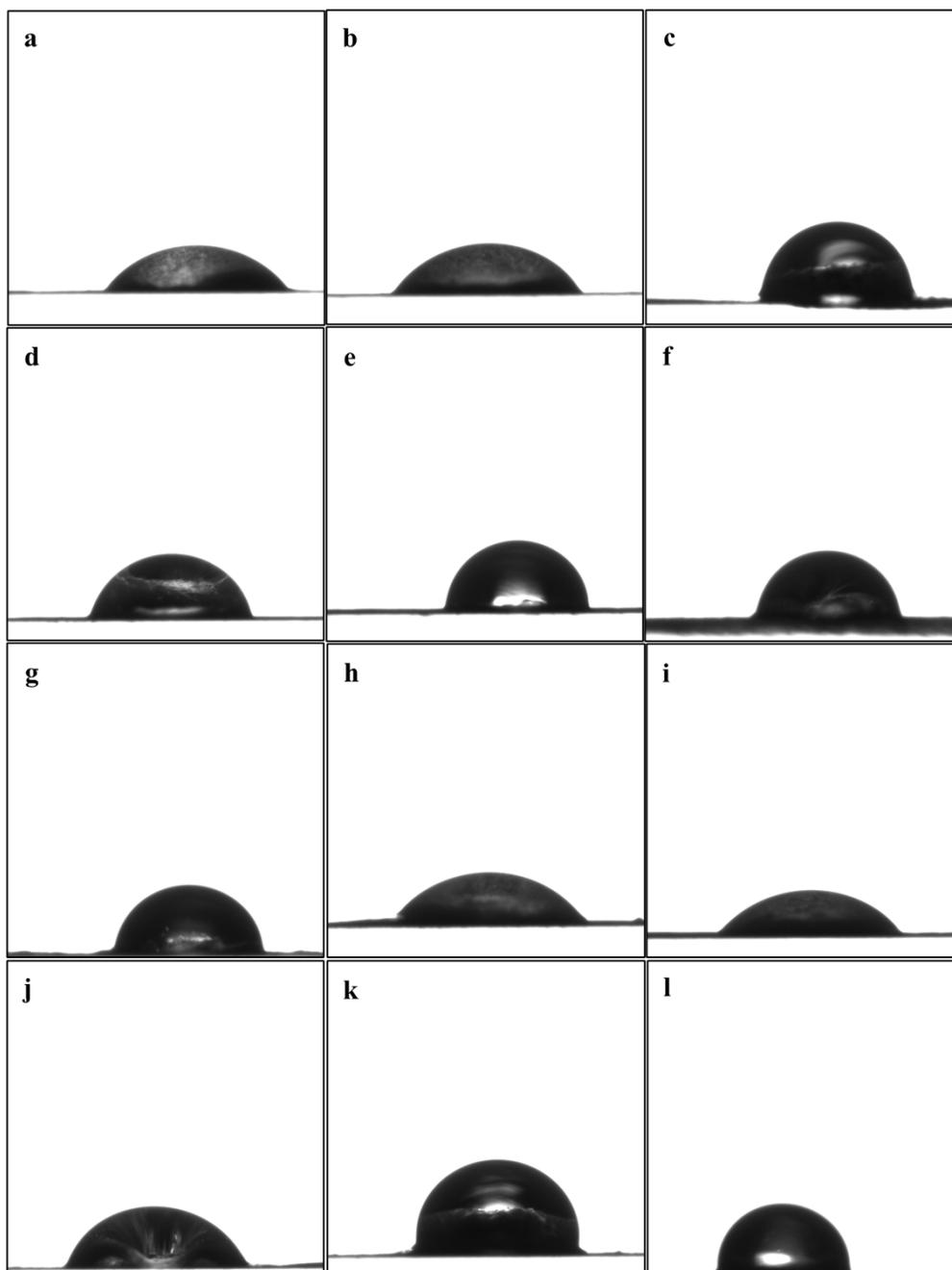


Figura 31. Imagens das gotas de água sobre a superfície dos filmes QTS (a), QL (b), QLA (c), QB50 (d), QB150 (e), QB250 (f), QBL50 (g), QBL150 (h), QBL250 (i), QBLA50 (j), QBLA150 (k) e QBLA250 (l) adquiridas para medida do ângulo de contato.

Já a combinação de BNZ e GML levou a um leve aumento no ângulo de contato, quando comparado com a QTS, e uma diminuição significativa, quando comparado com os filmes QB. Este comportamento indica que a combinação de GML e BNZ, dispersos na matriz polimérica não levaram grandes alterações no ângulo de contato quando comparados com a QTS, dando indícios da não diminuição do potencial mucoadesivo dos

filmes. Outro comportamento interessante para a composição QBL é que a adição de quantidades crescentes de GML levou a uma diminuição crescente no ângulo de contato. Os comportamentos descritos acima também podem ser observados na Figura 32. Em síntese, a adição de BNZ e BNZ combinados com LA, elevaram de forma significativa a hidrofobicidade dos filmes.

5.5.5 Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 33 apresenta os espectros de FTIR para os componentes puros e para todos os sistemas desenvolvidos na forma de filme. Como já supracitado, para o BNZ as principais bandas de absorção são de amina secundária (N-H, 3274 cm^{-1}), estiramento da carbonila da amida secundária (C=O, 1661 cm^{-1}), deformação axial de aromáticos (C-H, $3130, 3112, 3067$ e 3032 cm^{-1}), deformação C-C de aromáticos ($1500, 1486$ e 1418 cm^{-1}), vibração de amina aromática (C-N, 1364 e 1336 cm^{-1}) e deformação N-O entre 1660 e 1500 cm^{-1} (De Melo *et al.*, 2013; Lidani *et al.*, 2019; Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, 2005; Soares-Sobrinho *et al.*, 2010). Para o monoglicerídeo GML, as bandas mais relevantes são um sinal forte de -OH em 3320 cm^{-1} , estiramento de ligação C-H de alifáticos entre 2960 e 2850 cm^{-1} , um sinal de éster em 1730 cm^{-1} e estiramento C-O em 1260 e 1000 cm^{-1} (Glavcheva-Laleva *et al.*, 2015; Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, 2005). O ácido láurico, sendo um precursor para a síntese do GML, apresenta espectros similares, porém a banda de OH apresenta um sinal fraco na região de 3430 cm^{-1} e um sinal em 933 cm^{-1} , apresenta uma banda de carbonila em 1699 cm^{-1} e não apresenta banda de éster e estiramento C-O (Jiang *et al.*, 2018).

A quitosana apresenta uma banda larga na região em 3233 cm^{-1} referente a sobreposição dos estiramentos N-H e O-H, estiramento C-H simétrico e assimétrico em 2920 e 2878 cm^{-1} , estiramento C=O de amida em 1636 e C-N amina secundária em 1320 cm^{-1} , dobramento de iminas primárias em 1542 cm^{-1} . A banda em 1152 cm^{-1} é referente ao estiramento assimétrico (β -1-4) C-O-C e os sinais em 1020 e 1064 cm^{-1} são referentes ao estiramento C-O (Queiroz *et al.*, 2015).

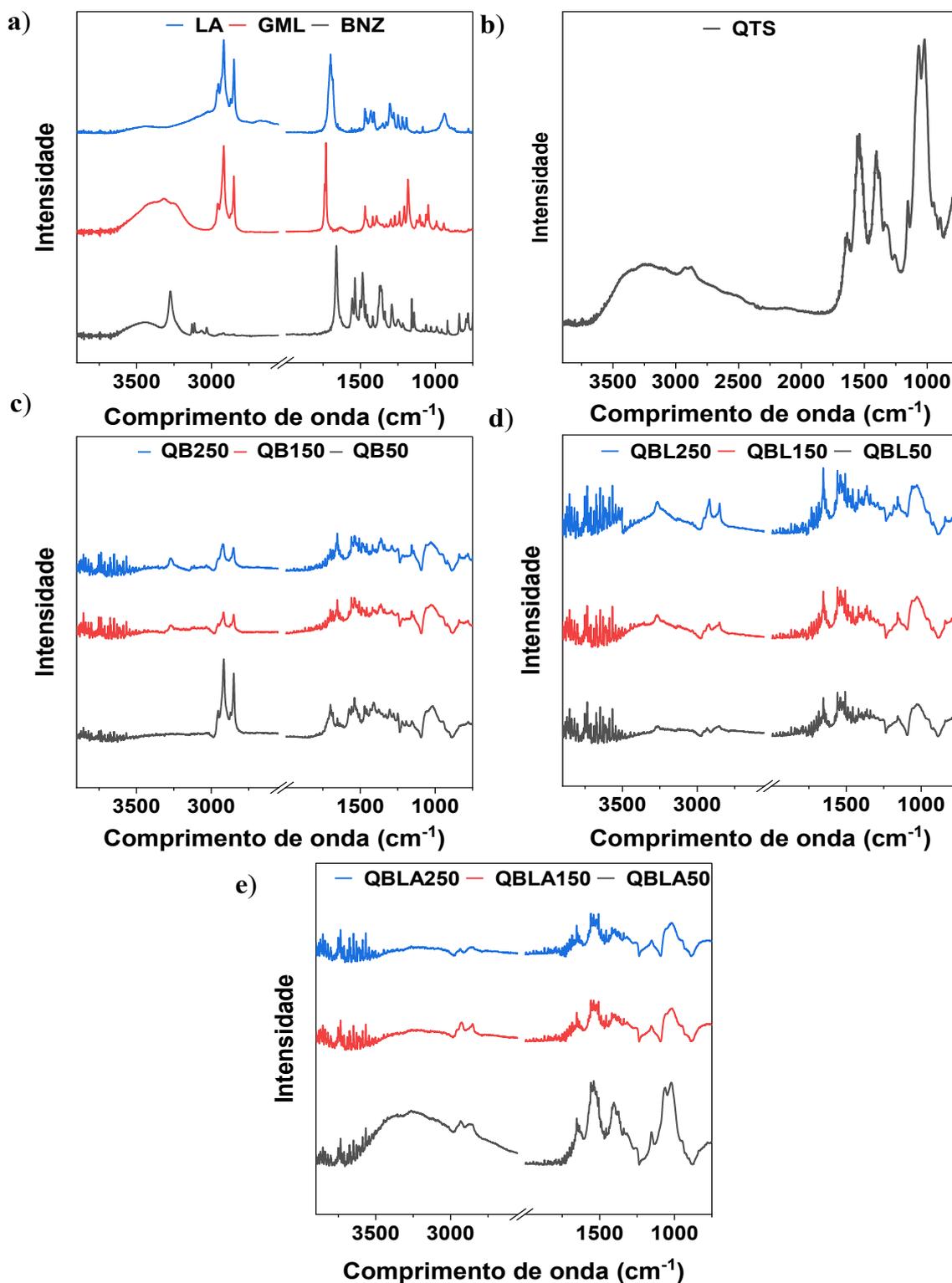


Figura 32. Espectros de infravermelho dos componentes puros BNZ, GML e LA (a) e QTS (b), assim como dos filmes nas três concentrações de BNZ: QB50, QB150 e QB250 (c), QBL50, QBL150 e QBL250 (d) e QBLA50, QBLA150 e QBLA250 (e).

Os sinais apresentados para os componentes puros tiveram uma redução considerável quando analisados nas misturas. A banda em 1150 não mostrou alteração em nenhuma das misturas, indicando que não ocorreu degradação da ligação glicosídica da quitosana, corroborando com os resultados de DSC já mencionados na seção 5.2.1. Com exceção da amostra QBLA50, ocorreu o acoplamento das bandas referentes ao estiramento C-O do polímero. Quando comparadas as misturas com o filme de quitosana pura, observou-se uma redução significativa das bandas referentes à O-H e N-H, indicando que houve uma diminuição significativa das interações de hidrogênio polímero-polímero. A redução da umidade dos filmes devido a um aumento do caráter hidrofóbico com a adição do BNZ. Porém para todos os filmes ocorreu um deslocamento e uma diminuição da intensidade da banda da carbonila do BNZ de 1661 para 1653 cm^{-1} , indicando interação entre ambos os componentes, sendo mais expressivo nas amostras QB e QBL. Para a banda referente a ligação N-H do BNZ, observa-se a sua ausência nas amostras QLA e QB50, indicando uma melhora na compatibilização ou a sobreposição das bandas do ácido láurico, sendo possível notar o aumento do sinal com o aumento da concentração de BNZ. Em geral, observa-se a presença de interações entre todos os componentes de todos os filmes com o fármaco.

5.5.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Com o objetivo de avaliar as propriedades térmicas dos filmes e o efeito causado na adição dos excipientes na matriz de QTS, foram realizadas análises de calorimetria diferencial. O comportamento dos constituintes puros, GML e BNZ, são mencionados no capítulo II, e os mesmos na forma de filme, junto a quitosana podem ser observados na Figura 34. Os filmes QL50 e QL150 apresentam os eventos característicos do GML após recristalização, porém com alteração nas temperaturas, devido a compatibilização com a quitosana, resultado plausível, já que a mistura foi feita em solução e com aquecimento. A composição QL250 também apresenta um evento abaixo de 10°C, porém o evento subsequente apresenta dois eventos térmicos convoluídos. Para os filmes QLA (Figura 34d, e, f) observa-se um evento de fusão característico do LA e um aumento na temperatura de fusão do mesmo com o acréscimo da concentração, 34,8, 39,5 e 40,8°C, respectivamente, aproximando-se da temperatura do LA puro em 42,9°C (Tabela 13).

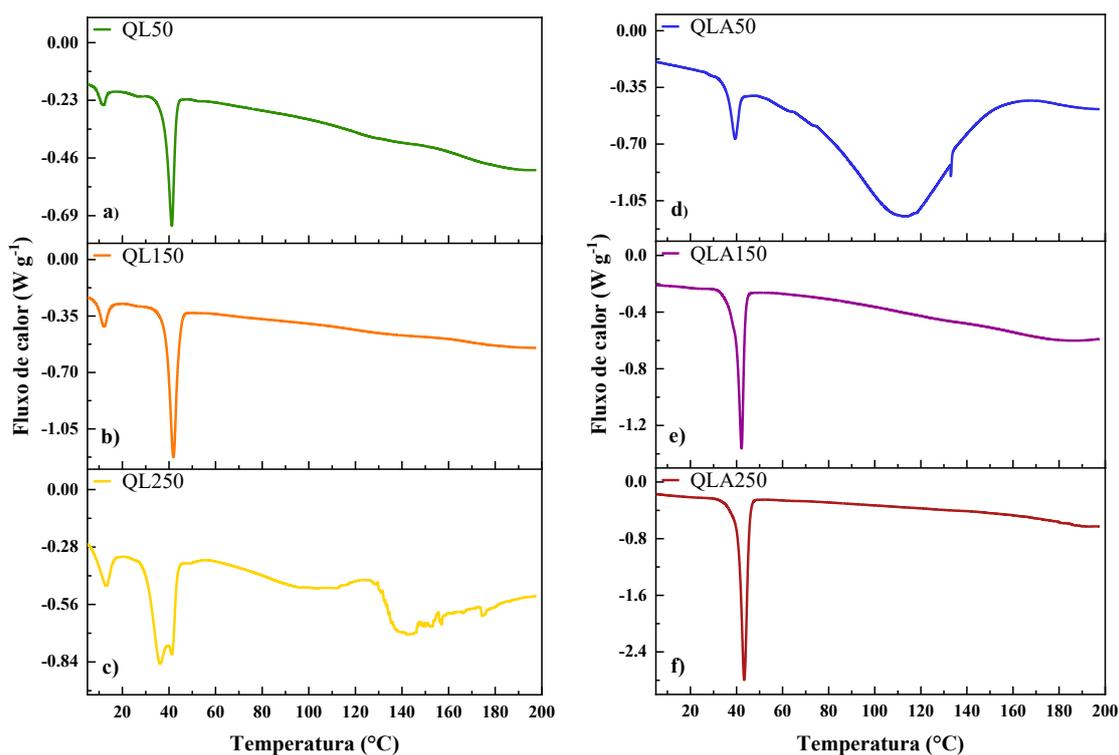


Figura 33. Curvas de DSC para os filmes de quitosana com glicerol monolaurato (QL50 (a), QL150 (b), QL250 (c)) e ácido láurico (QLA50 (d), QLA150 (e), QLA250 (f)) em três diferentes concentrações, sem a presença de BNZ.

As alterações visíveis nas transições térmicas da quitosana não serão reportadas e levadas em consideração, devido natureza heterogênea dos filmes observada anteriormente na seção 4.2.2 na Figura 26, junto a complexidade em identificar as transições do biopolímero.

Tabela 13. Valores de temperatura e entalpias de fusão das curvas calorimétricas apresentadas nas Figuras 34, 35, 36 e 37 e anexo 7.

Amostra	Transições térmicas									
	T ^a	$\Delta_{fus}H^b$	T ^a	$\Delta_{fus}H^b$	T ^a	$\Delta_{fus}H^b$	T ^a	$\Delta_{fus}H^b$	T ^a	$\Delta_{fus}H^b$
LA*	42,9	38,6								
QL50	9,00	2,50	37,6	5,80						
QL150	8,70	3,90	38,4	9,30						
QL250	6,60	5,50	30,1 - 44,4	13,6	54,0 - 127	-	130	-		
QLA50	34,8	7,90	51,0 - 159	86,6						
QLA150	39,5	8,60								
QLA250	40,8	15,5								
QB50	30,1	0,44	166	-	173	-				
QB150	32,6	8,90	168	-						
QB250	36,4	10,9	172	-						
QBL50	36,7	1,36	105	-	160	19,4				
QBL150	8,91	2,14	37,5	8,48	54,3	1,80	105	94,8		
QBL250	8,62	3,86	36,7	13,5	53,8	2,10	66,0 - 174	38,0	178	3,88
QBLA50	167	47,0								
QBLA150	180	45,0								
QBLA250	182	37,0								

^aTemperatura do evento endotérmico (°C); ^bEntalpia de fusão (J g⁻¹); *Curva em Anexo 7; “-” Entalpia de fusão não determinada.

As curvas de DSC para os filmes QB50, QB150 e QB250 sugerem as interações entre a QTS e o BNZ (Figura 35). Observa-se que o aumento da concentração de BNZ levou a um acréscimo nas temperaturas e entalpias de fusão, do primeiro evento, indicando que o evento está diretamente ligado a uma fração de fármaco que reduziu consideravelmente a temperatura de fusão.

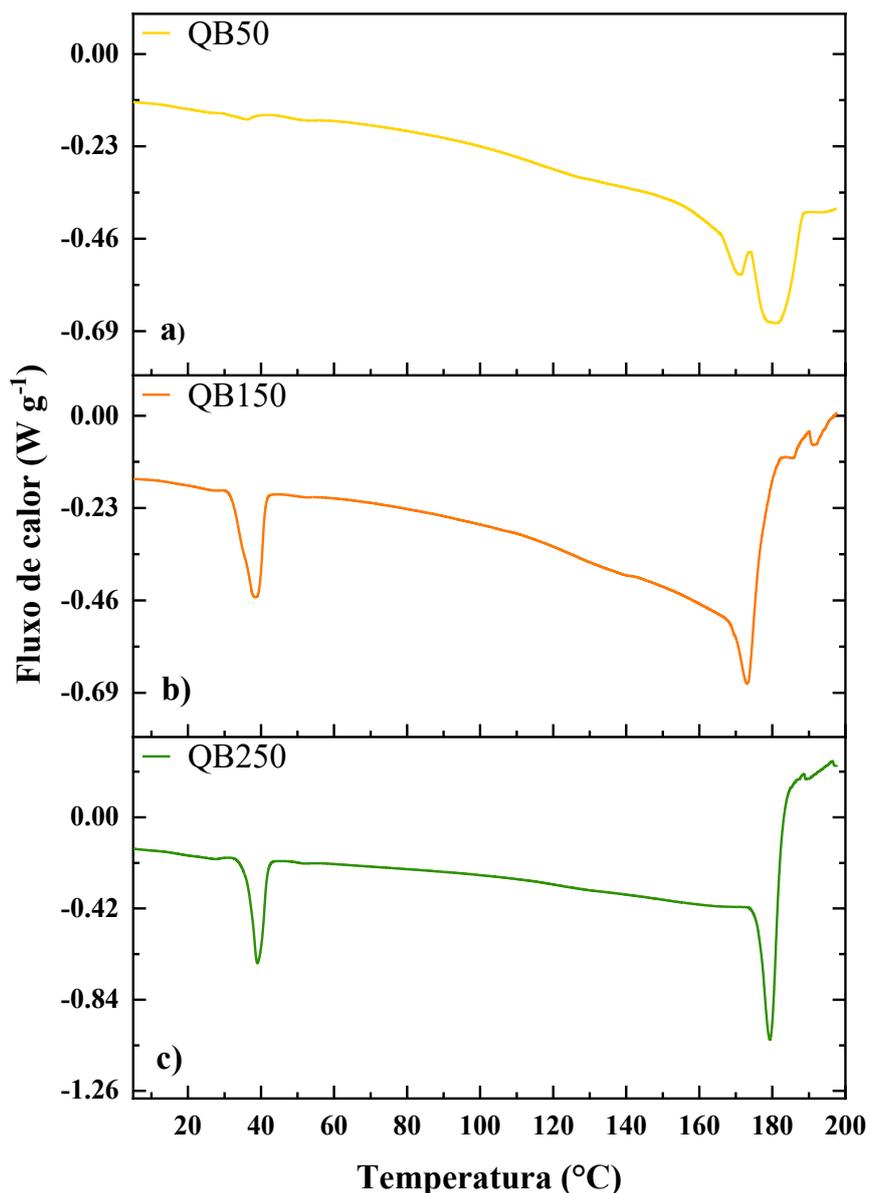


Figura 34. Curvas de DSC para os filmes a) QB50, b) QB150 e c) QB250.

Um segundo evento é encontrado próximo a região da T_g da quitosana, porém nenhum evento é encontrado próximo a fusão do BNZ em 189,7 $^{\circ}\text{C}$ (Tabela 14). Esses resultados sugerem que a porção não fundida do BNZ cristalino, após o primeiro evento de fusão, se fundiu próximo ou em conjunto com a transição vítrea da quitosana. Isso

sugere uma interação substancialmente positiva entre o BNZ e o polímero nessa faixa de temperatura. Outro ponto importante é o perfil da curva nas temperaturas elevadas, que mostra um evento endotérmico mais acentuado característico do BNZ nas maiores concentrações.

A adição de GML aos filmes de quitosana e BNZ são apresentados na Figura 36. O primeiro evento térmico dos filmes é característico dos eventos apresentados pela interação GML:QTS (Figura 34a, b e c), com exceção do filme QBL50 que mostra apenas uma transição térmica sutil.

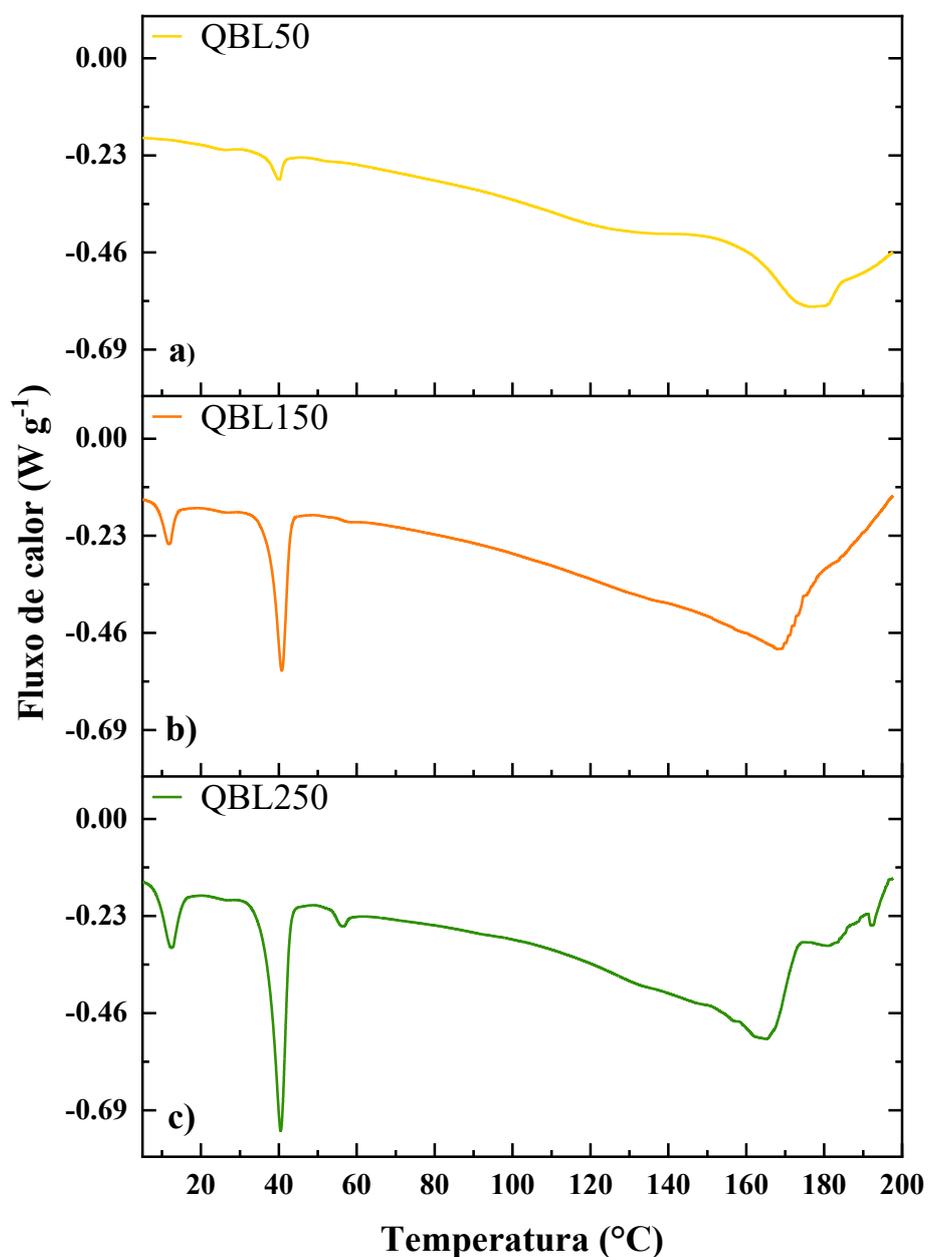


Figura 35. Curvas de DSC para os filmes a) QBL50, b) QBL150 e c) QBL250.

Em ambos os filmes QBL apresentaram um evento endotérmico largo, iniciando por volta dos 100°C, sem muita definição entre cada transição que ocorre durante o processo, porém a ausência de eventos claros de fusão do BNZ em torno de 189°C mostra que tanto a quitosana quanto o fármaco estão fundindo nesta faixa de temperatura. Uma exceção é observada amostra QBL250 que apresenta um evento em 178°C (com um perfil de fusão de moléculas cristalinas), indicando que o aumento da concentração de BNZ próximo ou acima de 250 mg leva a um excesso do mesmo.

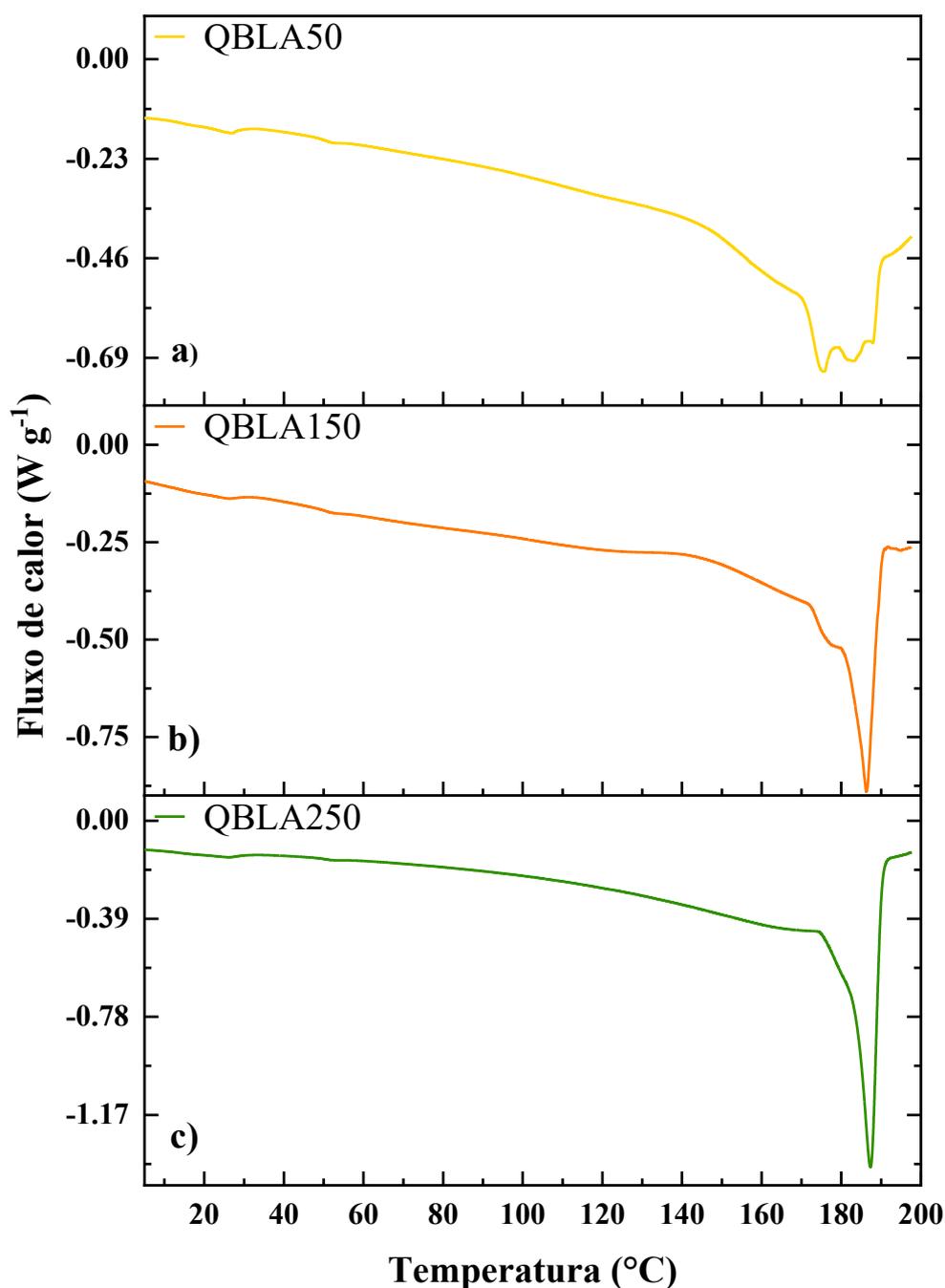


Figura 36. Curvas de DSC para os filmes a) QBLA50, b) QBLA150 e c) QBLA250.

Para as amostras QBLA, com a adição de LA, apresentadas na Figura 37 é observado a ausência do evento entre 30 e 40°C visualizado para as amostras QL. Isto indica que a mistura contendo o BNZ apresentou uma melhor homogeneização dos componentes. Porém com exceção do filme QBLA50, foi observado a presença de um único evento iniciando em aproximadamente 180°C, temperatura esta que está bem próxima a temperatura de fusão do fármaco. Logo, a adição de quantidades acima de 50 mg não seria indicada para uma formulação, principalmente quando comparado ao filme QBL por exemplo, que permite a adição de até 150 mg de BNZ. Novamente é observado que ocorre a formação de ligações de hidrogênio entre o BNZ e o excipiente são de fundamental importância para uma melhor compatibilização.

As análises de DSC desta seção agregam um grande grau de complexidade, tendo em vista a natureza amorfa do biopolímero, a quantidade de água residual na matriz e a elevada cristalinidade do BNZ.

5.5.7 Difrações de Raios-x

A difração de raios-X da matéria-prima do BNZ que já foi reportado no capítulo II, está representado novamente na Figura 38a, onde o padrão dos picos são 7,15, 10,6, 16,5, 21,6 e 25° em 2θ (Maximiano *et al.*, 2011a; Palmeiro-Roldán *et al.*, 2014b). Picos de difração característicos dos MGs, por sua vez, foram identificados em 9,50, e na região entre 19 e 24 ° em 2θ (Kuhrt; Welch; Kovarik, 1950; Zhang *et al.*, 2021) e para o LA são em 6,50, 9,70, 16,2, 21,5 e 23,6°.

Os padrões de difração de raios-X dos filmes QB são mostrados na Figura 39. Ambos os filmes mostram a presença de regiões cristalinas do BNZ, porém os picos característicos apresentam uma cauda na extremidade esquerda, devido a difração amorfa da quitosana. Outro comportamento observado foi o deslocamento de picos característicos do BNZ de 7,15 para 7,39, 10,6 para 10,9, 16,5 para 16,8, 21,6 para 21,9 e 25 para 25,4° em 2θ , gerando um deslocamento entre 0,20 e 0,30 graus em todos os filmes. Outro ponto é a deconvolução do ombro junto ao pico em 16,5° quando adicionado ao filme. Apesar dos difratogramas indicarem que o fármaco está em sua grande totalidade na forma cristalina, a interação do BNZ com a quitosana trouxe sutis alterações.

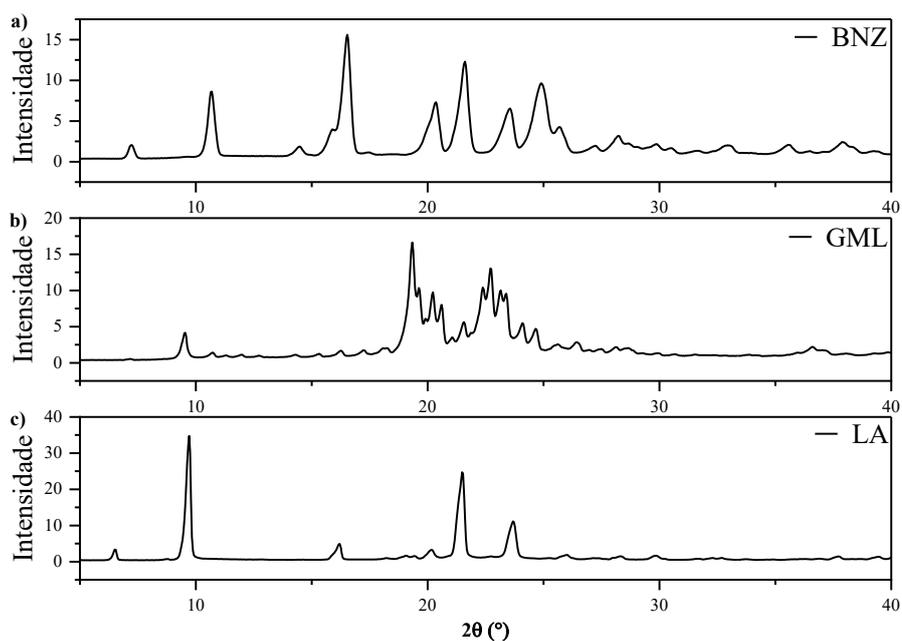


Figura 37. Difratogramas para a) BNZ, b) GML e c) LA.

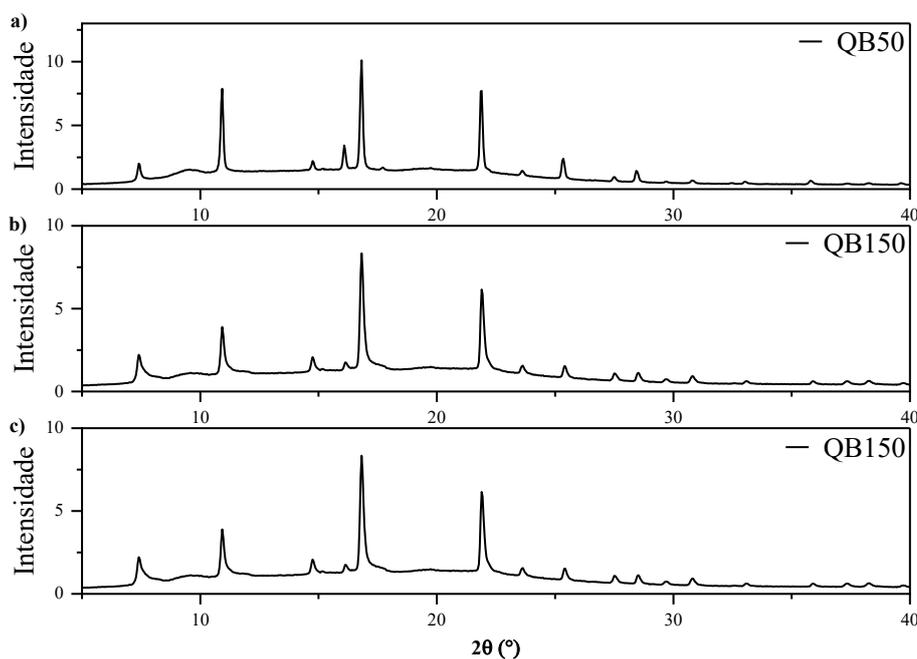


Figura 38. Difratogramas para a) QB50, b) QB150 e c) QB250.

Estes achados sustentam os resultados das análises de PLOM (seção 5.2.2), SEM (seção 5.2.3) e DSC (seção 5.2.6). O mesmo padrão é observado para os filmes QBL (Figura 40) e QBLA (Figura 41), somando apenas os picos característicos de cada excipiente aos difratogramas. Desta forma não foi observada nenhuma formação de novas

fases cristalinas (por exemplos novos polimorfos, sais ou cocrystalis), corroborando com os resultados obtidos na seção 3.2.4 quando estudado as misturas MG/BNZ.

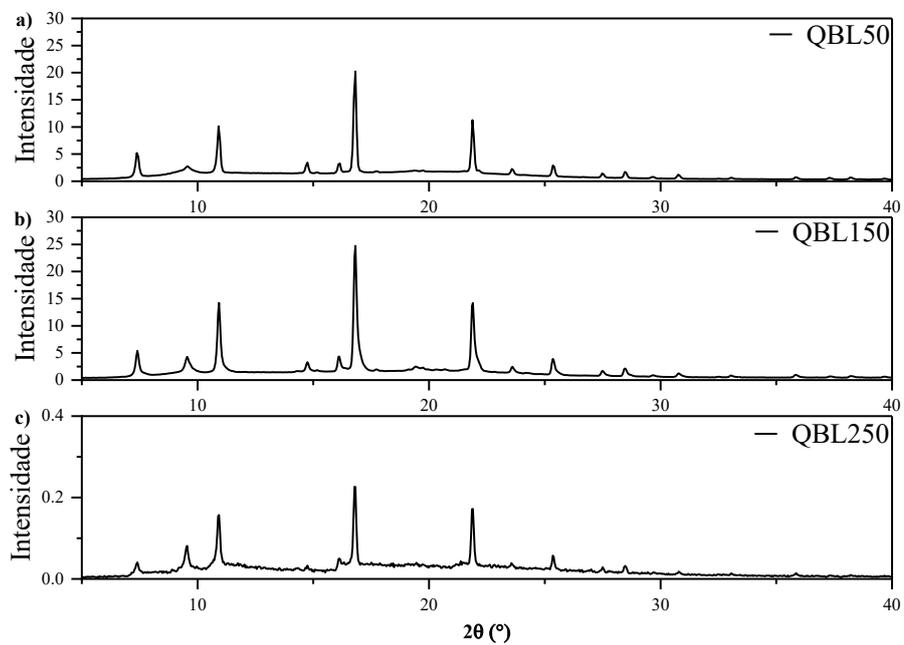


Figura 39. Difratoogramas para a) QBL50, b) QBL150 e c) QBL250.

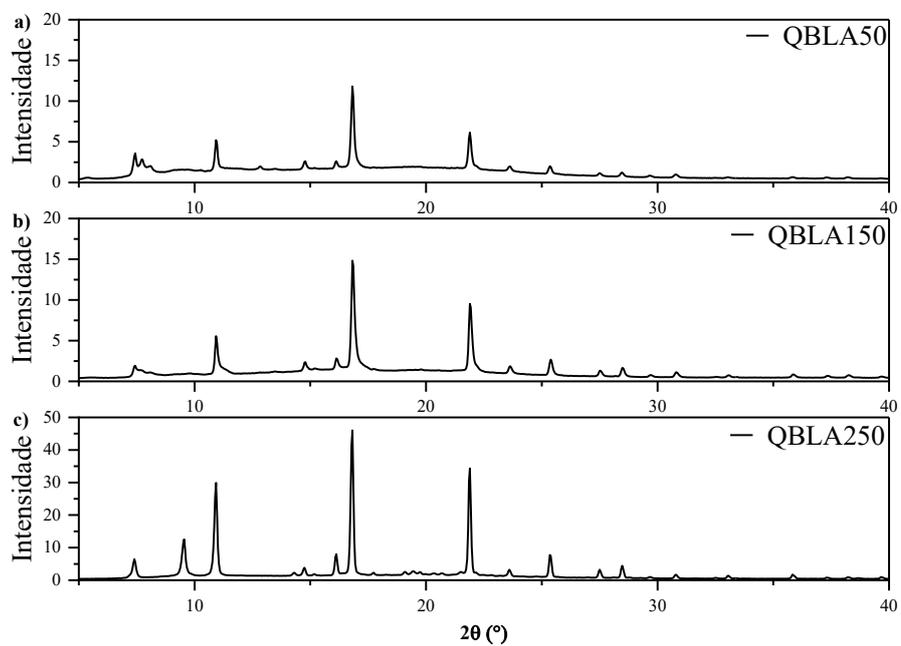


Figura 40. Difratoogramas para a) QBL50, b) QBL150 e c) QBL250.

5.5.8 Estudo de mucoadesão estática *in vitro*

A quitosana é um polímero carregado positivamente, devido a protonação do grupo amino, e podendo formar um complexo poli eletrolítico com mucinas que são carregadas negativamente, conferindo o um grande potencial de mucoadesão (Andrews; Laverty; Jones, 2009)(Smart, 2005b). Além do potencial para formação de complexos, também existem uma grande quantidade de interações de hidrogênio, além da flexibilidade da cadeia polimérica da quitosana que auxilia na interpenetração com a mucina (Mazzarino; Borsali; Lemos-Senna, 2014b). Filmes de quitosana já são amplamente relatados na literatura como estratégia na produção de dispositivos de liberação controlada em mucosas e peles (Borchard; Esmacili; Heuking, 2012b; Issa; Köping-Höggård; Artursson, 2005; Kang *et al.*, 2017; Mishra; Soni; Mehta, 2017; Sandri *et al.*, 2012; Sogias; Williams; Khutoryanskiy, 2008; Wang *et al.*, 2013).

Com o objetivo de avaliar a mucoadesão dos filmes perante a adição de carga, foram realizados ensaios de mucoadesão utilizando discos de mucina (Tolentino *et al.*, 2023b). A força necessária para separar o disco de mucina da superfície do filme é apresentada na Figura 42.

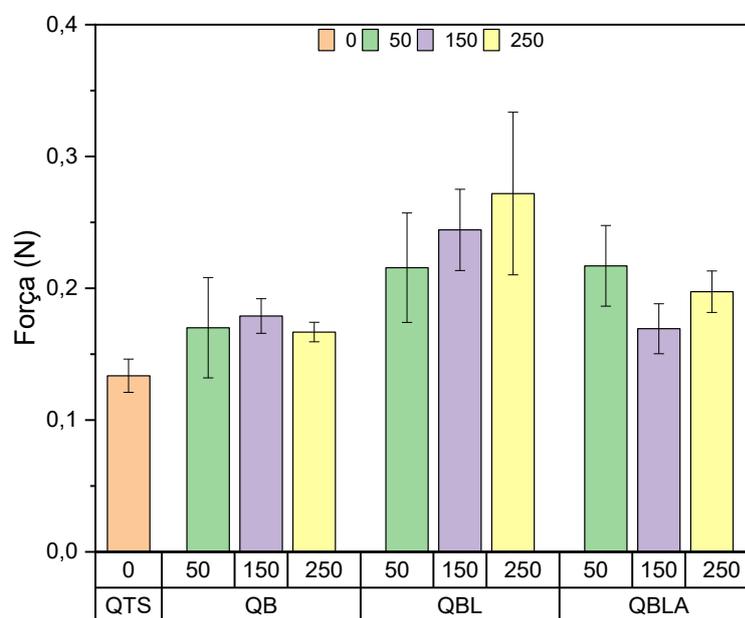


Figura 41. Ensaios de mucoadesão para os filmes.

Os resultados apontam que a adição de BNZ, LA e GML não reduziram a mucoadesão quando comparado ao filme de quitosana puro (QTS), com a exceção da amostra QB50, porém o dado pode não ser representativo devido ao grande desvio padrão.

Analisando os grupos separadamente não foram observadas variações significativas entre as diferentes concentrações de fármaco e fármaco:excipiente, mostrando que o aumento das concentrações dos aditivos na matriz de quitosana não afetaram a mucoadesão. Comparando GML e LA observa-se que a mistura contendo 150 mg do mesmo mostrou um aumento significativo para o filme QBL150, resultado da maior capacidade de ligação de hidrogênio do monoglicerídeo. Para uma aplicação em mucosa bucal é preferível o máximo de tempo de contato entre o filme e a mucosa, deste modo a proporção contendo 150 mg de fármaco e 150 mg de excipiente mostra-se uma das mais promissoras para os ensaios de permeação.

5.5.9 Estudo de permeabilidade do BNZ *ex vivo* em mucosa suína

O estudo de permeabilidade do BNZ foi realizado utilizando uma solução controle preparada em propileno glicol (PG), visto a baixa solubilidade em solução aquosa e não ser possível adicionar solventes orgânicos na fase doadora. A solução controle mostrou dados similares a estudos reportados por AMARAL et al (2020) (Amaral *et al.*, 2020), com um coeficiente de permeabilidade na ordem de 10^{-4} (Tabela 14).

Tabela 14. Parâmetros de permeabilidade do BNZ para a solução controle e os filmes de quitosana.

Amostra	J_s ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	T_L (h)	P cm h^{-1}	R^2
Controle	$2,32 \pm 0,055$	$0,68 \pm 0,371$	$9,46 \times 10^{-4}$	0,965
QBNZ	$3,30 \pm 0,26$	$2,14 \pm 0,072$	$1,45 \times 10^{-3}$	0,683
QBLA	$1,42 \pm 0,12$	$1,72 \pm 0,25$	$5,79 \times 10^{-4}$	0,969
QBL	$7,07 \pm 0,53$	$-1,09 \pm 0,72$	$2,88 \times 10^{-3}$	0,978

Média \pm Desvio padrão. J_s = fluxo; T_L = tempo de latência; P = coeficiente de permeabilidade.

O perfil de permeação (Figura 43) para as amostras QBNZ e QAL não mostrou diferença significativa quando comparado a solução controle, no entanto o coeficiente de permeabilidade foi maior em ambos os casos, principalmente para o filme contendo somente quitosana. Como esperado, o tempo de latência para os filmes é maior, devido o mecanismo de liberação do fármaco do interior da matriz polimérica. O maior coeficiente de permeação foi observado para a amostra QBL, da mesma forma que o maior valor de fluxo.

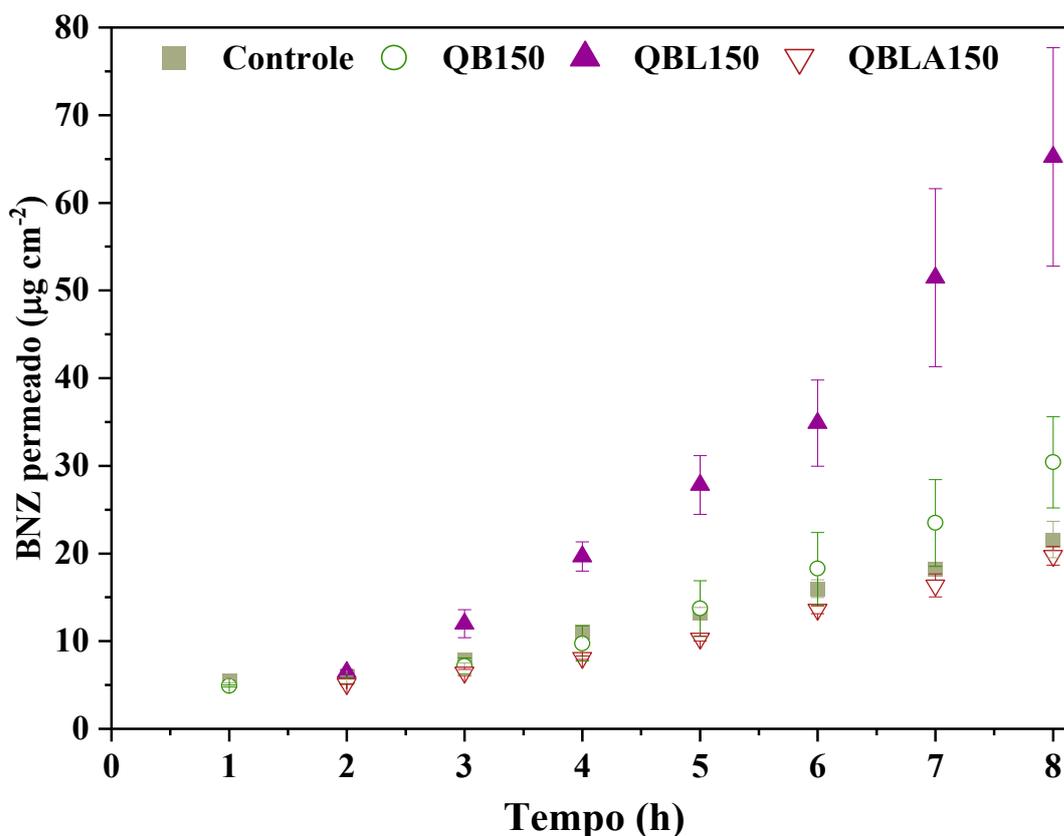


Figura 42. Perfil de permeabilidade do BNZ em mucosa bucal suína, para a solução controle ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) (■) e os filmes de quitosana: QB150 (●); QBL150 (▲) e QBLA150 (▼). ($n = 3$).

ZHANG et al (2016) reportam que o GML proporciona um aumento na proporção de lipídios em regiões ordenadas e desordenadas nas células T humanas, sugerindo que o GML altera a dinâmica de domínios lipídicos (Zhang; Sandouk; Houtman, 2016). (Fosdick *et al.*, 2021) observaram que a cabeça polar do GML é necessária para alterar a dinâmica de membranas lipídicas, inibir o agrupamento de proteínas e o fluxo de cálcio. O estudo também concluiu que o ácido láurico não causou nenhum efeito na membrana lipídica, no agrupamento de proteínas ou no fluxo de cálcio. Os estudos supracitados corroboram com os dados de permeabilidade obtidos, onde o filme com a adição de glicerol monolaurato mostrou resultados superiores aos obtidos com os filmes contendo ácido láurico, somente com quitosana e a solução controle.

Os filmes contendo quitosana e BNZ apresentaram resultados superiores aos encontrados por (Amaral *et al.*, 2021a), onde foram produzidos filmes poliméricos de PVAL, PVAL/PGL e PVAL/PGL/timol, todos contendo BNZ. Vários estudos apontam o potencial de mucoadesão da quitosana e a habilidade de abrir a junção entre as células

intestinais, melhorando a absorção de fármacos (Mendes *et al.*, 2017). Microesferas mucoadesivas de quitosana são reportadas em estudos para o transporte de diversas drogas, pelas vias: oral, bucal, ocular, nasal, vaginal e retal para efeitos sistêmicos ou locais (Patil; Sawant, 2008).

A Figura 44 (a, b, c) a seguir mostra imagens macroscópicas dos filmes após o experimento de permeação ainda úmidos, dentro da câmara doadora, já a Figura 44 (d, e, f) apresenta os mesmos após serem retirados da mucosa e secos. Os perfis de permeação são comparáveis com as características morfológicas dos filmes após 8 horas de contato com a mucosa. A permeabilidade inferior do sistema QB150 pode estar diretamente ligado com seu baixo potencial de intumescimento, visto que o filme se manteve próximo ao tamanho original após 8h de contato e o formato plano e circular após a secagem. O sistema QBLA150, apesar de ser mais suscetível ao intumescimento comparado ao QB150, observado na Figura 44 (c, f), apresentou um perfil de permeação inferior. Este comportamento pode estar diretamente ligado com sua elevada hidrofobicidade, causada pelo LA. As observações macroscópicas para a amostra QBL150 corroboram com o perfil de permeação, visto o ganho de tamanho que o sistema obteve após a análise (Figura 44e) e o aumento na mucoadesão.

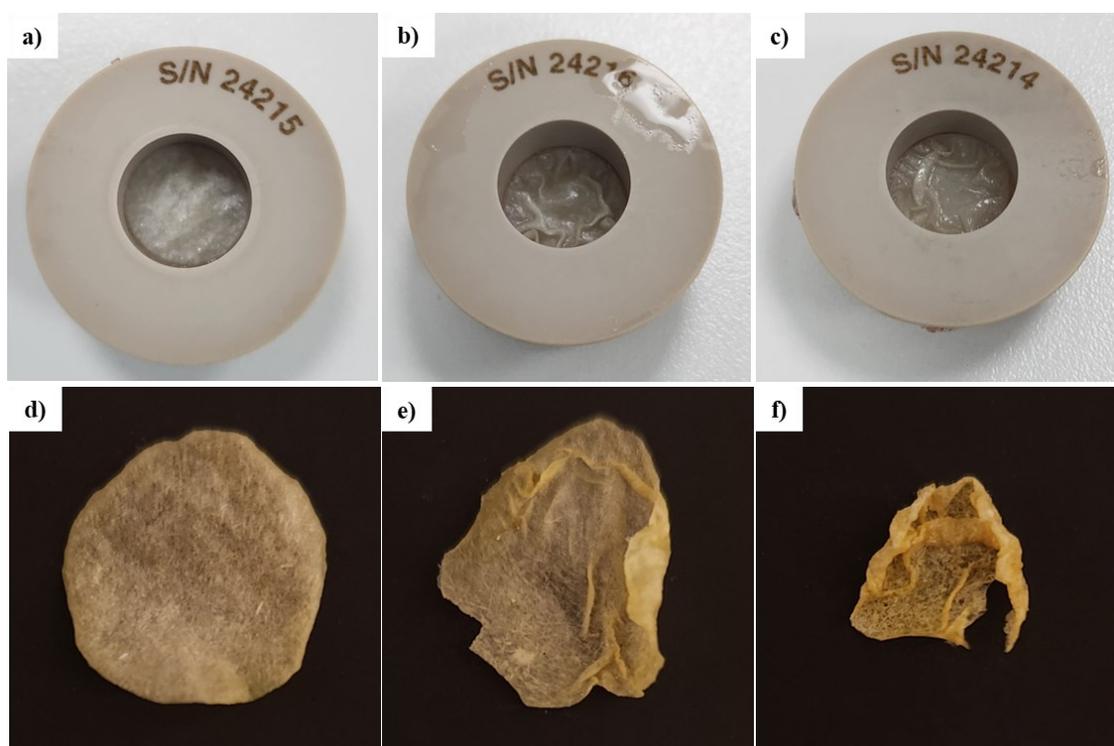


Figura 43. Imagens macroscópicas dos filmes após a finalização do ensaio de permeação, intumescidos: a) QB150, b) QBL150 e c) QBLA150 e secos: d) QB150, d) QBL150 e f) QBLA150.

Com o objetivo de avaliar o estado das membranas após o processo de permeação foram adquiridas imagens por SEM, tanto da face que esteve em contato com a mucosa (Figura 45a, d, g), quanto na face oposta (Figura 45b, e, h) e da secção transversal (Figura 45c, f, i). As faces que não estavam em contato com a mucosa mantiveram uma aparência similar a dos filmes antes da permeação, uma superfície mais homogênea e com a presença de cristais de BNZ bem longos. Já a face que estava em contato com a mucosa, é notada uma grande quantidade de cristais de BNZ expostos, possivelmente causada por uma erosão pronunciada de quitosana. É possível concluir que, pela grande quantidade de cristais aparentes e a baixa permeabilidade apresentada, apenas a quitosana não foi suficiente para aumentar a dissolução e permeação do BNZ.

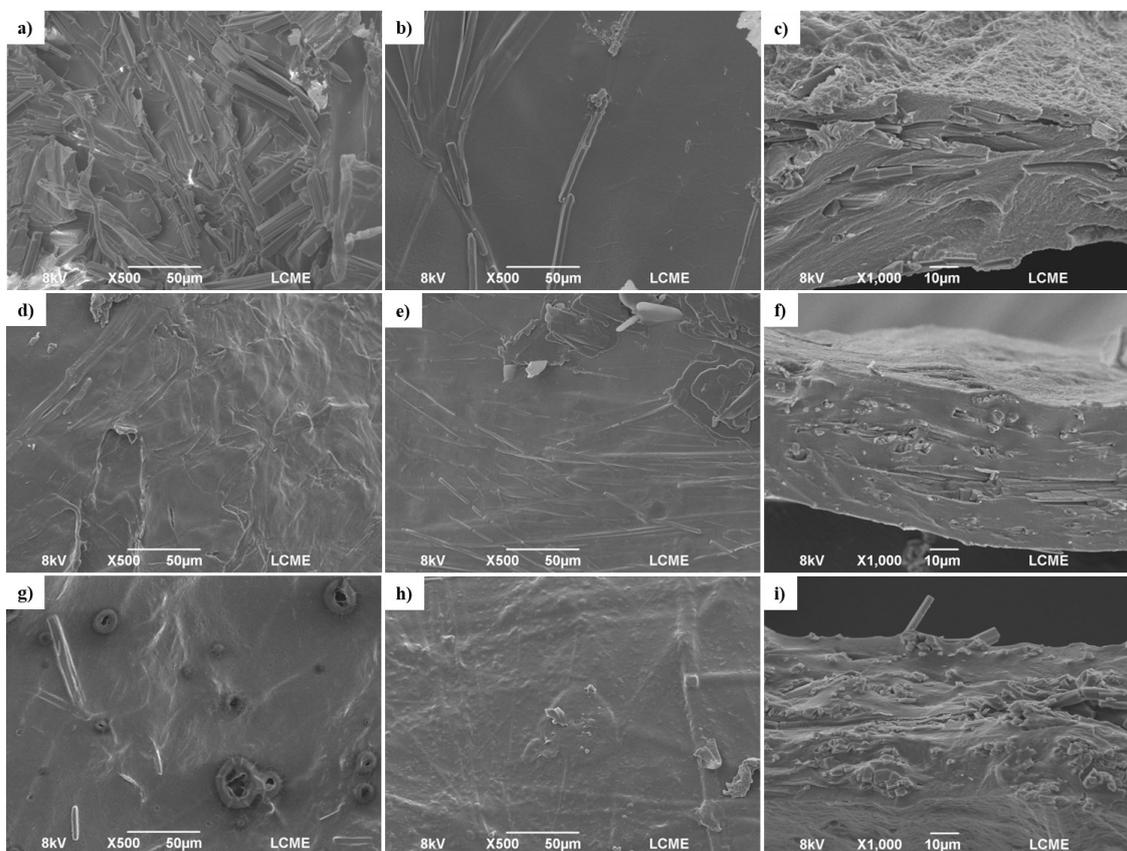


Figura 44. Micrografias dos filmes secos pós permeação QB150: (a) face superior, (b) face inferior e (c) face transversal, QLA150: (d) face superior, (e) face inferior e (f) face transversal, e QBL150: (g) face superior, (h) face inferior e (i) face transversal.

Para o filme QBL é possível observar uma superfície com poucos cristais de BNZ, mostrando que uma grande quantidade do mesmo foi solubilizado e permeou através da mucosa. Esse padrão era antecipado, considerando a afinidade significativa do GML com o BNZ, o que resulta no aumento da solubilidade do BNZ na solução. No entanto, ao examinar o filme de QBLA, nota-se a presença de algumas crateras, bem como alguns

cristais, sugerindo uma efetiva solubilização e permeação. Contrastando isso, na seção transversal, é evidente a presença de uma considerável quantidade de cristais não solubilizados e não permeados.

5.6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

A metodologia para produção dos filmes de quitosana através do aquecimento da solução a 80°C e da adição controlada de uma solução de acetona, contendo o ativo hidrofílico, mostrou-se promissora. Os resultados indicaram uma melhor uniformidade do fármaco na matriz, e a inclusão de acetona e da temperatura não afetaram a integridade da quitosana. As análises calorimétricas para QB e QBL revelaram um novo ponto de fusão entre 30 e 40°C, bem como uma redução na temperatura de fusão do BNZ. A incorporação do BNZ e dos excipientes na matriz de quitosana não tiveram impacto na mucoadesão. Os dados de difração de raios-X (DRX) demonstraram que o BNZ ainda se mantém cristalino na amostra, sem a formação de novos polimorfos. Quanto à permeabilidade, o filme QB150 apresentou resultados promissores, exibindo um bom fluxo de permeação em comparação com a solução controle e com os filmes QB150 e QBLA150. O uso do GML também se mostrou promissor, tanto como um excipiente quanto como um promotor de permeabilidade para o BNZ. O estudo sugere que os filmes de quitosana contendo BNZ e GML são viáveis para o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica de baixo custo para a liberação de BNZ através da mucosa bucal.

7. CONCLUSÃO

- O GML foi mais eficaz no aumento da solubilidade do BNZ que pode estar relacionado a boa interação fármaco-excipiente por ligação de hidrogênio entre o grupo imidazol do BNZ e a região polar do GML.

- A maior solubilidade do BNZ com o aumento das proporções de monoglicérides, é provavelmente explicado pela redução do grau de cristalinidade e/ou temperatura de fusão do BNZ.

- A energia dos métodos de mistura não mostrou diferenças significativas na compatibilização fármaco-excipiente.

- Os solventes mais indicados para realizar uma extração de BNZ da mucosa bucal suína são etanol e acetonitrila.

- O método de HPLC de fase reversa com coluna C18, fase móvel de H₂O/ACN (60:40 (v/v)) como fase móvel, temperatura de 35 °C e uma tempo de corrida de 12,5 min, mostrou-se eficiente na quantificação de BNZ para ensaios de permeação em mucosa bucal suína;

- A metodologia para produção dos filmes de quitosana através do aquecimento da solução a 80°C e da adição controlada de uma solução de acetona, contendo o ativo hidrofílico, mostrou-se promissora e não afetou a integridade da quitosana;

- O BNZ incorporado a matriz ainda se mantém na fase cristalina, porém foi observado uma redução nas temperaturas de fusão (QB e QBL).

- A adição de BNZ, GML e LA não reduziram a mucoadesão quando comparado ao quitosana pura, com exceção do filme QB50.

- Os ensaios de permeabilidade para o filme QBL150 ($65,2 \pm 1,05 \mu\text{g cm}^2$) mostraram um acréscimo de 2 vezes na permeabilidade quando comparado a solução controle ($21,9 \pm 12,5 \mu\text{g cm}^2$).

- O desempenho similar na permeação entre os filmes QB e QBLA, indicam que a adição do LA não trouxe ganhos na permeabilidade.

- O filme QBL150 mostrou-se promissor para o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica de baixo custo para a liberação de BNZ através da mucosa bucal. A partir dos resultados obtidos nos estudos de permeação.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRI, Eleni *et al.* High resolution NMR spectroscopy as a structural and analytical tool for unsaturated lipids in solution. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 1–71, 2017.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.-A. *et al.* Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. **Revista Médica del Hospital General de México**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 154–164, 2018.

ALVES-SILVA, I. *et al.* Preformulation studies of itraconazole associated with benznidazole and pharmaceutical excipients. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 575, p. 29–33, 2014.

AMARAL, Beatriz Ribeiro *et al.* Development and characterization of thermopressed polyvinyl alcohol films for buccal delivery of benznidazole. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 119, n. July 2020, p. 111546, 2021a.

AMARAL, Beatriz Ribeiro *et al.* Development and characterization of thermopressed polyvinyl alcohol films for buccal delivery of benznidazole. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 119, n. July 2020, p. 111546, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111546>.

AMARAL, Beatriz Ribeiro *et al.* European Journal of Pharmaceutical Sciences Transbuccal delivery of benznidazole associated with monoterpenes : permeation studies and mechanistic insights. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 143, n. July 2019, p. 105177, 2020.

ANDREWS, Gavin P.; LAVERTY, Thomas P.; JONES, David S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 505–518, 2009.

ARRÚA, Eva C *et al.* Acta Tropica Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease : A review. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 198, n. July, p. 105080, 2019.

BALBANI, Aracy Pereira Silveira; STELZER, Lucilena Bardella; MONTOVANI, Jair Cortez. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 400–406, 2006.

BARRERA, María G. *et al.* A Novel Prototype Device for Microencapsulation of Benznidazole: In Vitro/In Vivo Studies. **AAPS PharmSciTech**, [*s. l.*], v. 21, n. 3, p. 1–9, 2020.

BEZERRA, Beatriz Pinheiro *et al.* Cocrystal Polymorphs and Solvates of the Anti-Trypanosoma cruzi Drug Benznidazole with Improved Dissolution Performance. **Crystal Growth and Design**, [*s. l.*], v. 20, n. 7, p. 4707–4718, 2020.

BEZERRA, Camila *et al.* Enhancement of dissolution rate through eutectic mixture and solid solution of posaconazole and benznidazole. [*s. l.*], v. 525, p. 32–42, 2017.

BHOWMIK, Nirmalendu Bikash *et al.* Carotid atherosclerosis in diabetic patients with Ischemic Stroke: an experience at BIRDEM. **Bangladesh Journal of Neuroscience**, [*s. l.*], v. 29, n. 1, p. 24–30, 2013.

BOECHAT, Núbia; MAGALHAES, Jorge. Once upon a time... neglected diseases. **Revista Virtual de Química**, [*s. l.*], v. 4, n. 3, p. 195–196, 2012.

BORCHARD, Gerrit; ESMAEILI, Farnaz; HEUKING, Simon. Chitosan-Based Delivery Systems for Mucosal Vaccination. **Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics**, [*s. l.*], p. 211–224, 2012a.

BORCHARD, Gerrit; ESMAEILI, Farnaz; HEUKING, Simon. Chitosan-Based Delivery Systems for Mucosal Vaccination. **Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics**, [*s. l.*], p. 211–224, 2012b.

BUSCAGLIA, Carlos A.; DI NOIA, Javier M. Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, [*s. l.*], v. 5, n. 5, p. 419–427, 2003.

CALVO, Natalia L. *et al.* Chitosan-hydroxypropyl methylcellulose tioconazole films: A promising alternative dosage form for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Pharmaceutics**, [*s. l.*], v. 556, n. November 2018, p. 181–191, 2019.

CAMPOS, Patrícia Mazureki; PRAÇA, Fabíola Silva Garcia; BENTLEY, Maria Vitória Lopes Badra. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 1019, p. 66–71, 2016.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACEDO, V. Influência da parasitemia na evolução da doença de Chagas crônica The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas ' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 1–6, 2005.

CHEN, L. **Emulsifiers as food texture modifiers**. [S. l.]: Elsevier Ltd., 2015. v. 1

CHEN, Mei Ling. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 768–777, 2008.

CHIDI, Obi; ADEBAYO, Idowu Victor. Determination of Critical Micelle Concentration and Thermodynamic Evaluations of Micellization of GMS. **Modern Chemistry & Applications**, [s. l.], v. 06, n. 02, 2018.

CORONEL, María Verónica Pacheco *et al.* Adverse systemic reaction to benznidazole. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 145–147, 2017.

COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

CZYRSKI, Andrzej; SZNURA, Justyna. The application of Box-Behnken-Design in the optimization of HPLC separation of fluoroquinolones. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

DE ARAUJO, Inesita Soares; MOREIRA, Adriano De Lavor; AGUIAR, Raquel. **Doenças negligenciadas, comunicação negligenciada. Apontamentos para uma pauta política e de pesquisa** – DOI: 10.3395/reciis.v6i4.Sup1.738pt. **Reciis**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2013.

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

DE MELO, Polyanne N. *et al.* **Interaction pathways of specific co-solvents with hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes with benznidazole in liquid and solid phase.** [S. l.: s. n.], 2016a.

DE MELO, Polyanne N. *et al.* Interaction pathways of specific co-solvents with hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes with benznidazole in liquid and solid phase. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 223, p. 350–359, 2016b.

DE PONTES, V. M O *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 182–187, 2010.

DE SOUZA, Wanderley; DE CARVALHO, Tecia Maria Ulisses; BARRIAS, Emile Santos. **Ultrastructure of Trypanosoma cruzi and its interaction with host cells.** First Editioned. [S. l.]: Elsevier Inc., 2010-. ISSN 978-0-12-384876-5.

ENOSE, Arno A. *et al.* Formulation and Characterization of Solid Dispersion Prepared by Hot Melt Mixing: A Fast Screening Approach for Polymer Selection. **Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 2014, p. 1–13, 2014.

ENUMO, Adalberto *et al.* Development of curcumin-loaded chitosan/pluronic membranes for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 163, p. 167–179, 2020.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation. **Science Medicines Health**, [s. l.], v. 44, n. March, p. 57, 2019.

FENG, Xiangru *et al.* Electrospun polymer micro/nanofibers as pharmaceutical repositories for healthcare. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 302, n. March, p. 19–41, 2019.

FERRAZ, Leslie Raphael de Moura *et al.* Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 185, p. 127–132, 2018.

FERREIRA, Ariela Mota *et al.* Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 354–362, 2019.

FOSDICK, Micaela G. *et al.* Suppression of human T cell activation by derivatives of glycerol monolaurate. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

FRAGA, P.V., FREITAS, G. Excipientes Comumente Utilizados Em Cápsulas E Novas Perspectivas Excipients Commonly Used in Capsules and New Perspectives. [s. l.], v. 46, p. 46–50, 2015.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975.

GARDOUH, A. Design and Characterization of Glyceryl Monostearate Solid Lipid Nanoparticles Prepared by High Shear Homogenization. **British Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 326–346, 2013.

GESZKE-MORITZ, Malgorzata; MORITZ, Michal. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles : Composition , properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 68, p. 982–994, 2016.

GHANDI, Mehdi *et al.* Efficient synthesis of α -monoglycerides via solventless condensation of fatty acids with glycerol carbonate. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 84, n. 7, p. 681–685, 2007.

GLAVCHEVA-LALEVA, Z. *et al.* Obtaining of Modifiers for Reduced Friction by Esterification of Waste Glycerol from Biodiesel Production and Sulfat 2. **Chemical Engineering and Science**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–6, 2015.

GONTIJO, Maria Katarine Costa Lucas *et al.* Characterization of adverse reactions to benznidazole in patients with chagas disease in the Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 53, n. October 2019, p. 3–7, 2020.

GRATIERI, Tais *et al.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics A poloxamer / chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 186–193, 2010.

HANEEF, Jamshed; ALI, Shakir; CHADHA, Renu. Review Article Emerging Multi-Drug Eutectics : Opportunities and Challenges. [*s. l.*], 2021.

HONORATO, Sara Braga *et al.* Novel polymorphs of the anti-Trypanosoma cruzi drug benznidazole. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [*s. l.*], v. 118, p. 389–394, 2014.

ISSA, Mohamed M.; KÖPING-HÖGGÅRD, Magnus; ARTURSSON, Per. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. **Drug Discovery Today: Technologies**, [*s. l.*], v. 2, n. 1, p. 1–6, 2005.

JASPART, Séverine *et al.* is equivalent to SLNs. [*s. l.*], v. 2, n. 1, p. 75–87, 2005.

JIANG, Jinyang *et al.* Design of a novel nanocomposite with C-S-H@LA for thermal energy storage: A theoretical and experimental study. **Applied Energy**, [*s. l.*], v. 220, n. July, p. 395–407, 2018.

KANG, Bong Seok *et al.* Enhancing the in vitro anticancer activity of albendazole incorporated into chitosan-coated PLGA nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 159, p. 39–47, 2017.

KOVAČEVIĆ, Strahinja *et al.* Chemometrics of anisotropic lipophilicity of anticancer androstane derivatives determined by reversed-phase ultra high performance liquid chromatography with polar aprotic and protic modifiers. **Journal of Chromatography A**, [*s. l.*], v. 1673, 2022.

KUHRT, Noel H; WELCH, Eileen A; KOVARIK, Frank j. Molecularly Distilled Monoglycerides I. Preparation and Properties. **The Journal of the American Oil**, [*s. l.*], n. 165, p. 310–313, 1950.

KULKARNI, Upendra *et al.* Porcine Buccal Mucosa as an In Vitro Model: Relative Contribution of Epithelium and Connective Tissue as Permeability Barriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*s. l.*], v. 98, n. 2, p. 471–483, 2009.

LAFFLEUR, Flavia. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [*s. l.*], v. 40, n. 5, p. 591–598, 2014.

LAMAS, María C. *et al.* Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, [*s. l.*], v. 307, n. 2, p. 239–243, 2006.

LEFAPE. **Lafepe conquista classificação da Organização Mundial de Saúde.** [S. l.], 2008. Disponível em: <https://www.lafepe.pe.gov.br/noticias/lafepe-conquista-classificacao-da-organizacao-mundial-de-saude>. Acesso em: 15 fev. 2021.

LENSCHOW, Iára Cristina Schmücker *et al.* Ball-milled valsartan and its combination with mannitol: the case of drug polyamorphism. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 147, n. 16, p. 8765–8777, 2022.

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

LI, Qingsheng *et al.* Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. **Nature**, [s. l.], v. 458, n. 7241, p. 1034–1038, 2009.

LIDANI, Kárita Cláudia Freitas *et al.* Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. **Journal of Physical Oceanography**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 1–13, 2019.

LIEBERMAN, Shari; ENIG, Mary G.; PREUSS, Harry G. A Review of Monolaurin and Lauric Acid. **Alternative & Complementary Therapies**, [s. l.], n. December, p. 310–314, 2006.

LIMA, Adley A.N. Molecular Nanomedicine Towards Cancer. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2012.

LIMA, Ádley A.N *et al.* The Use of Solid Dispersion Systems in Hydrophilic Carriersto Increase Benznidazole Solubility. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2012.

LIU, Xu *et al.* Characterization of amorphous solid dispersions. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 19–41, 2018.

LOPES, Leonardo Quintana Soares *et al.* Characterisation and anti-biofilm activity of glycerol monolaurate nanocapsules against *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 130, n. November 2018, p. 178–185, 2019a.

LOPES, Leonardo Q.S. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of glycerol monolaurate nanocapsules against American foulbrood disease agent and toxicity on bees. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 97, p. 183–188, 2016.

LOPES, Leonardo Quintana Soares *et al.* Glycerol monolaurate nanocapsules for biomedical applications: in vitro toxicological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 392, n. 9, p. 1131–1140, 2019b.

LOPES, Leonardo Quintana Soares *et al.* Nanocapsules with glycerol monolaurate: Effects on *Candida albicans* biofilms. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 97, p. 119–124, 2016.

LUCAS-ABELLÁN, C *et al.* EFFECT OF TEMPERATURE, pH, β - AND HP- β -CDs ON THE SOLUBILITY AND STABILITY OF FLAVANONES: NARINGENIN AND HESPERETIN. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 108, n. July, p. 233–239, 2019.

LUO, Chunyan *et al.* Evaluation of monolaurin from camphor tree seeds for controlling food spoilage fungi. **Food Control**, [s. l.], v. 46, p. 488–494, 2014.

LUTTON E. S. Review of the Polymorphism of: Saturated Chains of Unequal Length. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], p. 276–281, 1950.

LYRA, Magaly A.M. *et al.* Study of benznidazole-cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 1–4, p. 397–404, 2012.

MANSURI, Shakir *et al.* Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 100, p. 151–172, 2016.

MAXIMIANO, Flávia Pires *et al.* Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 377–384, 2011a.

MAXIMIANO, Flávia Pires *et al.* Polymorphic screen and drug-excipient compatibility studies of the antichagasic benznidazole. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 819–824, 2011b.

MAXIMIANO, Flávia Pires; COSTA, Guilherme Hideki Yoshizane; SOUZA, Jacqueline. Caracterização Físico-Química do Fármaco Antichagásico Benznidazol. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1714–1719, 2010.

MAZZARINO, Letícia; BORSALI, Redouane; LEMOS-SENNA, Elenara. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 11, p. 3764–3771, 2014a.

MAZZARINO, Letícia; BORSALI, Redouane; LEMOS-SENNA, Elenara. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 11, p. 3764–3771, 2014b.

MENDES, Cassiana *et al.* Chitosan microencapsulation of the dispersed phase of an O/W nanoemulsion to hydrochlorothiazide delivery. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 611–622, 2017.

MIAO, Song; LIN, Duanquan. **Monoglycerides: Categories, Structures, Properties, Preparations, and Applications in the Food Industry**. [S. l.]: Elsevier, 2019.

MISHRA, Vijay *et al.* Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1–21, 2018.

MISHRA, Renuka; SONI, Kripali; MEHTA, Tejal. Mucoadhesive vaginal film of fluconazole using cross-linked chitosan and pectin: In vitro and in vivo study. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 130, n. 3, p. 1683–1695, 2017.

MOLINA, I. *et al.* Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 10, p. 6125–6131, 2015.

MORAN-VALERO, María I; RUIZ-HENESTROSA, Víctor M Pizones; PILOSOFF, Ana M R. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Synergistic performance of lecithin and glycerol monostearate in oil / water emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 151, p. 68–75, 2017.

MOREL, Carlos M. [Innovation in health and neglected diseases]. **Cadernos de saude publica**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1522–3, 2006.

MUSA TROLIC, Ines *et al.* Corrosion of orthodontic archwires in artificial saliva in the presence of *Lactobacillus reuteri*. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 370, n. April, p. 44–52, 2019.

NAKMODE, Deepa *et al.* Fundamental Aspects of Lipid-Based Excipients in Lipid-Based Product Development. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 4, 2022.

NAMBIAR, Amritha G *et al.* Continuous Manufacturing and Molecular Modeling of Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], 2022.

NAMBOODIRI, M. M. Tejas; PAKSHIRAJAN, Kannan. **Valorization of waste biomass for chitin and chitosan production**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, National Center for Biotechnology. **UbChem Compound Summary for CID 14871, 2,3-Dihydroxypropyl dodecanoate**. [S. l.], 2021.

NDAYISHIMIYE, John *et al.* Understanding the relationship between solubility and permeability of γ -cyclodextrin-based systems embedded with poorly aqueous soluble benzimidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 616, n. January, 2022.

NEMATPOUR, Najmeh *et al.* The application of nanomaterial science in the formulation a novel antibiotic: Assessment of the antifungal properties of mucoadhesive clotrimazole loaded nanofiber versus vaginal films. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 110, n. December 2019, p. 110635, 2020.

NG, Wei Seng *et al.* Biocompatible Polyurethane Scaffolds Prepared from Glycerol Monostearate-Derived Polyester Polyol. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 2881–2900, 2018.

NOTARIO-PÉREZ, Fernando *et al.* Development of mucoadhesive vaginal films based on HPMC and zein as novel formulations to prevent sexual transmission of HIV. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 570, n. August, p. 118643, 2019.

NUNES, Maria Carmo Pereira *et al.* Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 767–776, 2013.

OLIVEIRA, Paula M. *et al.* LC–MS bioanalytical method for simultaneous determination of latanoprost and minoxidil in the skin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 187, 2020.

OLIVERA, Mario J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1–13, 2017.

PADERNI, Carlo *et al.* Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. e25–e34, 2012.

PALACE-BERL, Fanny. Planejamento , síntese e avaliação da atividade anti- T . cruzi de derivados furfurilidênicos com estruturas azometínica e oxadiazolínica. [s. l.], p. 235, 2012.

PALMEIRO-ROLDÁN, Ricardo *et al.* Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 472, n. 1–2, p. 110–117, 2014a.

PALMEIRO-ROLDÁN, Ricardo *et al.* Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 472, n. 1–2, p. 110–117, 2014b.

PATIL, Sanjay; SAWANT, Krutika. Mucoadhesive Microspheres: A Promising Tool in Drug Delivery. **Current Drug Delivery**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 312–318, 2008.

PAUCAR, Rocio; MORENO-VIGURI, Elsa; PÉREZ-SILANES, Silvia. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 28, p. 3154–3170, 2016a.

PAUCAR, Rocio; MORENO-VIGURI, Elsa; PÉREZ-SILANES, Silvia. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 28, p. 3154–3170, 2016b.

PEREIRA, Paulo Câmara Marques; NAVARRO, Elaine Cristina. Challenges and perspectives of Chagas disease: A review. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–8, 2013.

PINHEIRO, Eloan *et al.* Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 296–300, 2017.

PSIMADAS, Dimitrios *et al.* Molecular Nanomedicine Towards Cancer :. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2012.

QUEIROZ, Moacir Fernandes *et al.* Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 141–158, 2015.

RAPHAEL, Leslie *et al.* Acta Tropica Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 185, n. February, p. 127–132, 2018.

REAL, Daniel *et al.* Chitosan-based nanodelivery systems applied to the development of novel triclabendazole formulations. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1–18, 2018.

REGEV, Galit *et al.* Novel Application of Hot Melt Extrusion for the Manufacturing of Vaginal Films Containing Microbicide Candidate Dapivirine. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1–11, 2019.

REIS, Thaiene Avila *et al.* Simple and Selective HPLC-UV/Vis Bioanalytical Method to Determine Aluminum Phthalocyanine Chloride in Skin Permeation Studies. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, [s. l.], v. 2018, 2018.

ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, David J. Kiemle. **Spectrometric identification of organic compounds**. [S. l.: s. n.], 2005.

RUGBANK. **Benznidazole**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11989>. Acesso em: 20 set. 2020.

SAATKAMP, Rodrigo Henrique *et al.* Development of thymol nanoemulsions with potential application in oral infections. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 87, n. February, 2023a.

SAATKAMP, Rodrigo Henrique *et al.* Development of thymol nanoemulsions with potential application in oral infections. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 87, n. February, 2023b.

SAATKAMP, Rodrigo Henrique *et al.* Drug-excipient compatibility studies in formulation development: A case study with benznidazole and monoglycerides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 235, n. May, p. 115634, 2023c.

SADIQ, Sara *et al.* Potential of monolaurin based food-grade nano-micelles loaded with nisin Z for synergistic antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 71, p. 227–233, 2016.

SAHARAN, Vikas *et al.* Ordered mixing: mechanism, process and applications in pharmaceutical formulations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 240–259, 2008.

SALAMAT-MILLER, Nazila; CHITTCHANG, Montakarn; JOHNSTON, Thomas P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 1666–1691, 2005.

SALES, Policarpo Ademar *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SANCHES, Mariele P. *et al.* Chitosan-sodium alginate polyelectrolyte complex coating pluronic® F127 nanoparticles loaded with citronella essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 803–812, 2020a.

SANCHES, Mariele P. *et al.* Chitosan-sodium alginate polyelectrolyte complex coating pluronic® F127 nanoparticles loaded with citronella essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 803–812, 2020b.

SANDRI, G *et al.* The role of chitosan as a mucoadhesive agent in mucosal drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 275–284, 2012.

SANTOS, Fabiana L.A. *et al.* A study of photostability and compatibility of the anti-chagas drug Benznidazole with pharmaceuticals excipients. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 63–69, 2015.

SANTOS, Emily F. *et al.* Acute chagas disease in brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 1–16, 2020.

SANTOS SOUZA, Higo Fernando *et al.* Development and in vitro/in vivo evaluation of a novel benzimidazole liquid dosage form using a quality-by-design approach. **Tropical Medicine and International Health**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 1514–1522, 2017.

SARKARI, Marazban *et al.* Enhanced drug dissolution using evaporative precipitation into aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 243, p. 17–31, 2002.

SCHLIEVERT, Patrick M. *et al.* Glycerol Monolaurate Contributes to the Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity of Human Milk. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

SCHRAM, Caitlin J.; BEAUDOIN, Stephen P.; TAYLOR, Lynne S. Impact of polymer conformation on the crystal growth inhibition of a poorly water-soluble drug in aqueous solution. **Langmuir**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 171–179, 2015.

SELEEM, Dalia *et al.* In vitro evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. **PeerJ**, [s. l.], v. 2016, n. 6, p. 1–17, 2016.

SHAH, Rohan *et al.* Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability. [s. l.], n. Ldc, p. 11–23, 2015.

SHARMA, Mayank; SHARMA, Rajesh; JAIN, Dinesh Kumar. Nanotechnology Based Approaches for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Water Soluble Antihypertensive Drugs. **Scientifica**, [s. l.], v. 2016, 2016.

SIEGEL, I. A. Effect of chemical structure on nonelectrolyte penetration of oral mucosa. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 137–140, 1981.

SILVA, Luís Antônio Dantas *et al.* Evaluation of carvedilol compatibility with lipid excipients for the development of lipid-based drug delivery systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 2337–2344, 2016.

SINTOV, Amnon C.; BOTNER, Shafir. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro

permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 311, n. 1–2, p. 55–62, 2006.

SIRI-NGUAN, Nuchanart; NGAMCHARUSSRIVICHAI, Chawalit. Alkoxide-intercalated Mg–Al layered double hydroxides as selective catalysts for the synthesis of monoglycerides. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 273–289, 2016.

SMART, John D. Buccal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 507–517, 2005a.

SMART, John D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 1556–1568, 2005b.

SOARES SOBRINHO, José Lamartine *et al.* Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1534–1538, 2011.

SOARES-SOBRINHO, José Lamartine *et al.* A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1391–1396, 2010.

SOARES-SOBRINHO, José Lamartine *et al.* Benznidazole. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, [s. l.], v. 64, n. 3, 2008.

SOGIAS, Ioannis A; WILLIAMS, Adrian C; KHUTORYANSKIY, Vitaliy V. Why is Chitosan Mucoadhesive ?. [s. l.], p. 1837–1842, 2008.

SOUSA, Lucas R.D. *et al.* Trypanocidal activity and increased solubility of benznidazole incorporated in PEG 4000 and its derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1162–1172, 2021.

SPAHN, Jamie E.; ZHANG, Feng; SMYTH, Hugh D.C. Mixing of dry powders for inhalation: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 619, n. April, p. 121736, 2022.

SPERANDIO DA SILVA, Gilberto Marcelo *et al.* Benznidazole treatment safety: the Médecins Sans Frontières experience in a large cohort of Bolivian patients with

Chagas' disease. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 2596–2601, 2017.

STRECK, Leticia *et al.* Surfactant-cosurfactant interactions and process parameters involved in the formulation of stable and small droplet-sized benzimidazole-loaded soybean O/W emulsions. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 196, p. 178–186, 2014.

TALELE, Purnima; SAHU, Saugata; MISHRA, Ashok Kumar. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles comprised of glycerol monostearate and bile salts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 172, n. September, p. 517–525, 2018.

TARESCO, Vincenzo *et al.* Properties of acyl modified poly(glycerol-adipate) comb-like polymers and their self-assembly into nanoparticles. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 20, p. 3267–3278, 2016.

TEIXEIRA, Antonio R L; NASCIMENTO, Rubens J; STURM, Nancy R. Texeira_et al_Evolution and pathology in Chagas disease - A Review.pdf. [s. l.], v. 101, n. August, p. 463–491, 2006.

TIAN, Yiwei *et al.* Construction of Drug – Polymer Thermodynamic Phase Diagrams Using Flory – Huggins Interaction Theory: Identifying the Relevance of Temperature and Drug Weight Fraction to Phase Separation within Solid Dispersions. [s. l.], 2013.

TIAN, Yu *et al.* Oromucosal films: from patient centricity to production by printing techniques. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 981–993, 2019.

TOLENTINO, Seila *et al.* Curcumin quantification in skin and mucosa: Optimization of extraction and chromatographic method validation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 1217, n. January, 2023a.

TOLENTINO, Seila *et al.* Curcumin quantification in skin and mucosa: Optimization of extraction and chromatographic method validation. **Journal of**

Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, [s. l.], v. 1217, n. January, 2023b.

VAN DOOREN, A. A.; MÜLLER, B. W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC)-a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 217–233, 1984.

VAN HEYNINGEN, W. E. *et al.* The Disease. **Cholera**, [s. l.], p. 1–29, 2019.

VIEIRA DINIZ, Melina Luiza *et al.* Microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography for determination of benznidazole in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 1219, n. February, p. 123640, 2023.

VINUESA, Teresa *et al.* Benznidazole nanoformulates: A chance to improve therapeutics for Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1469–1476, 2017a.

VINUESA, Teresa *et al.* Benznidazole nanoformulates: A chance to improve therapeutics for Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1469–1476, 2017b.

VIOTTI, Rodolfo *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: Fears and realities. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 157–163, 2009.

WANG, Linlin *et al.* Exploration of hydrophobic modification degree of chitosan-based nanocomplexes on the oral delivery of enoxaparin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 50, n. 3–4, p. 263–271, 2013.

WANG, Fan C.; MARANGONI, Alejandro G. Effect of intrinsic and extrinsic factors on the stability of the α -gel phase of a glyceryl monostearate-water system. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 54, p. 43121–43129, 2015.

WANG, Fan C.; MARANGONI, Alejandro G. Nature and dynamics of monostearin phase transitions in water: Stability and the sub- α -gel phase. **RSC Advances**, [s. l.], v. 4, n. 92, p. 50417–50425, 2014.

WANG, Fan C.; PEYRONEL, Fernanda; MARANGONI, Alejandro G. Phase Diagram of Glycerol Monostearate and Sodium Stearoyl Lactylate. **Crystal Growth and Design**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 297–306, 2016a.

WANG, Fan C.; PEYRONEL, Fernanda; MARANGONI, Alejandro G. Phase Diagram of Glycerol Monostearate and Sodium Stearoyl Lactylate. **Crystal Growth and Design**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 297–306, 2016b.

WHALEY, Kevin J. *et al.* Novel Approaches to Vaginal Delivery and Safety of Microbicides: Biopharmaceuticals, Nanoparticles, and Vaccines. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 88, n. SUPPL., p. S55–S66, 2010.

WHO. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018. [s. l.], p. 2018, 2013.

WIENS, Matthew O. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the pharmacokinetics of benznidazole in the treatment of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 7035–7042, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, World health. **Distribution of R&D funding flows for neglected diseases by country, funder, and recipient organizations**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and-development/monitoring/distribution-of-r-d-funding-flows-for-neglected-diseases-by-country-funder-recipient-organization>. Acesso em: 20 jan. 2021.

XIA, Dengning *et al.* Design of lipid matrix particles for fenofibrate: Effect of polymorphism of glycerol monostearate on drug incorporation and release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 697–705, 2014.

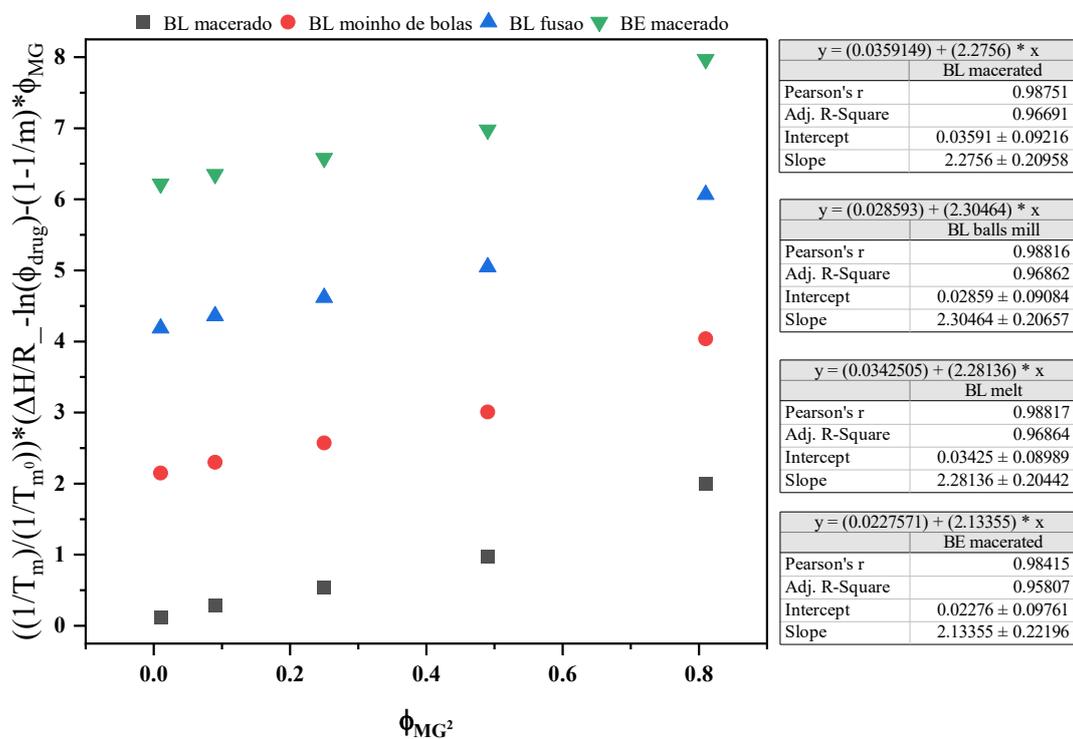
YU, Che Chul *et al.* bouwstoffen en korrelvormige afvalstoffen Onderdeel: Uitloogonderzoek. [s. l.], v. 24, n. 8, p. 3–10, 2013.

ZHANG, Xinyan *et al.* Fabrication and characterization of fast dissolving glycerol monolaurate microemulsion encapsulated gelatin nanofibers with antimicrobial activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 101, n. 13, p. 5660–5670, 2021.

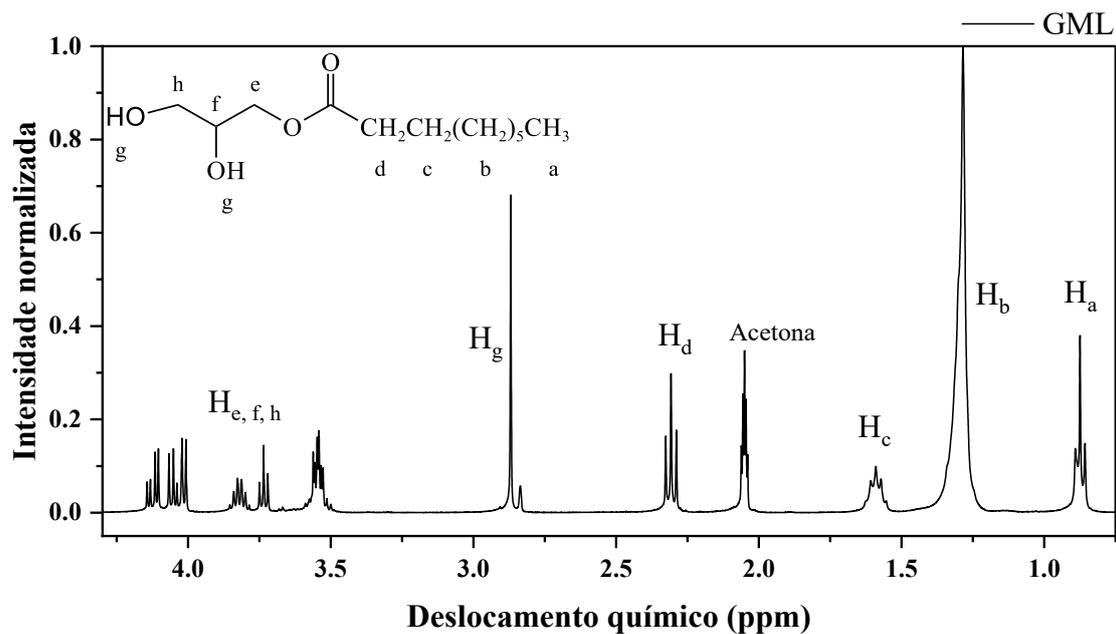
ZHANG, Yipeng *et al.* Superior water stability and antimicrobial activity of electrospun gluten nanofibrous films incorporated with glycerol monolaurate. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 109, n. April, p. 106116, 2020.

ZHANG, Michael S.; SANDOUK, Aline; HOUTMAN, Jon C.D. Glycerol Monolaurate (GML) inhibits human T cell signaling and function by disrupting lipid dynamics. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. February, p. 1–13, 2016.

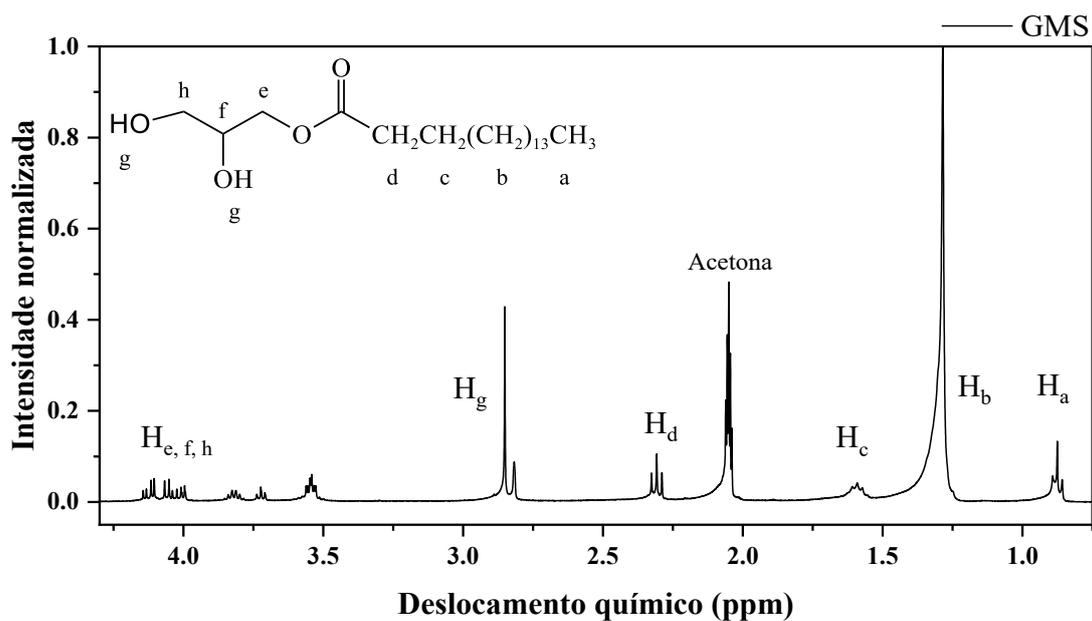
ANEXOS



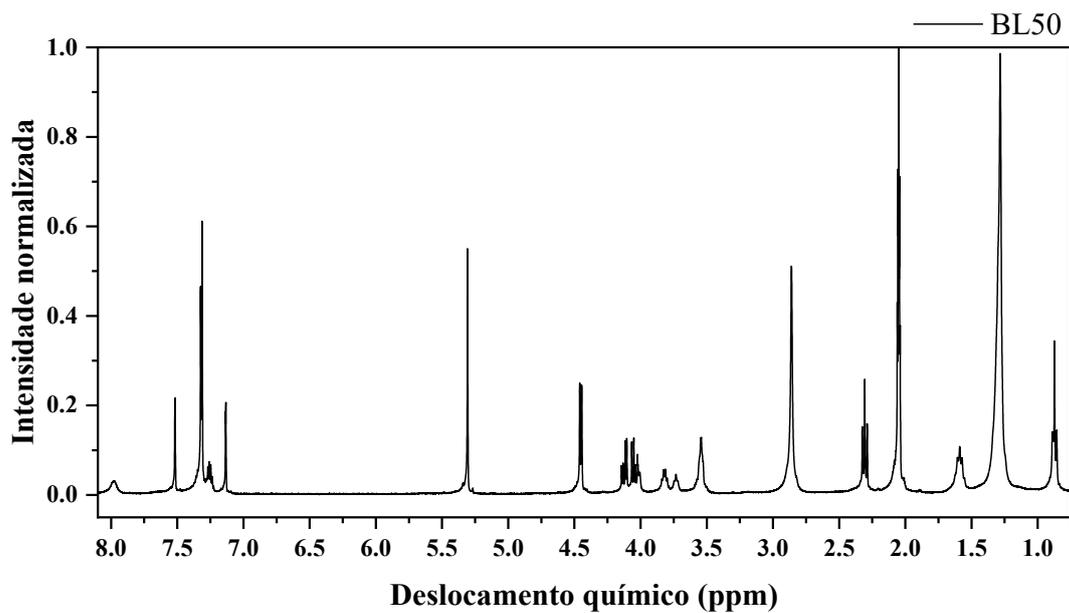
Anexo 1. Ajuste dos parâmetros de Flory Huggins, para as misturas BLMa, BLMo, BLMe and BEMa.



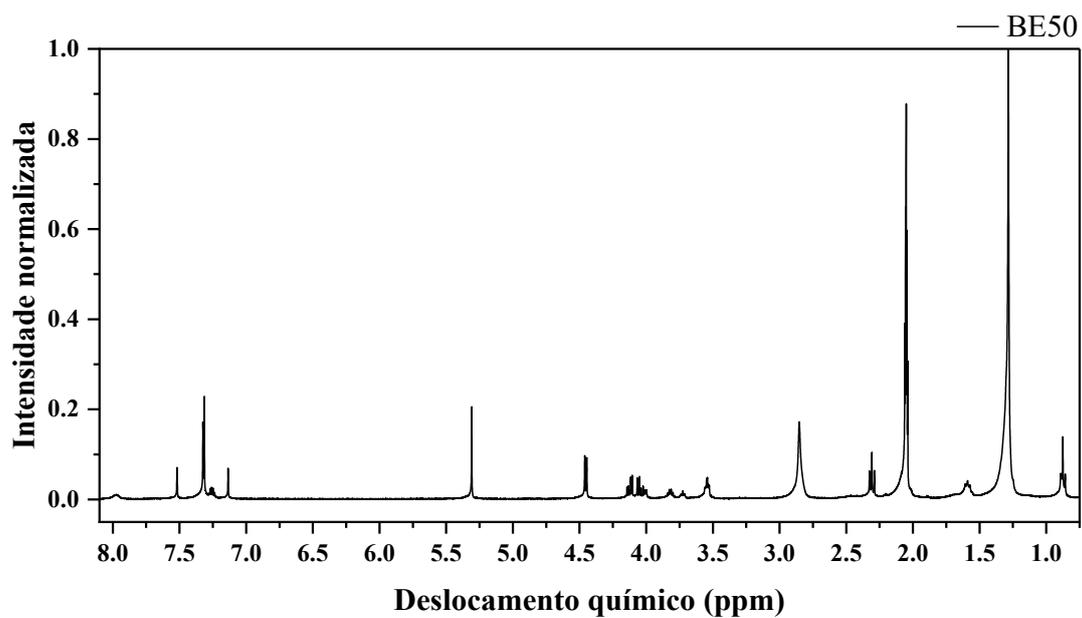
Anexo 2. Espectro de ^1H NMR para o GML em acetona deuterada.



Anexo 3. Espectro de ^1H NMR para o GMS em acetona deuterada.



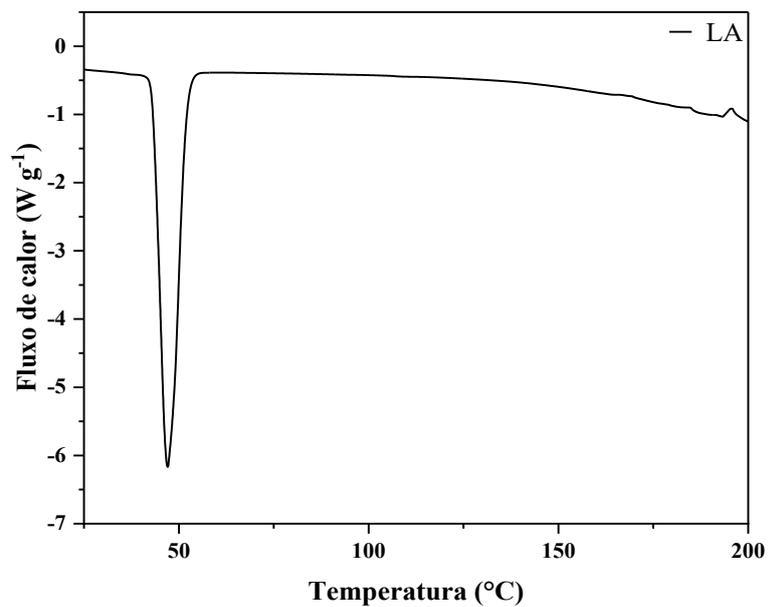
Anexo 4. Espectro de ^1H NMR para o BL50 em acetona deuterada.



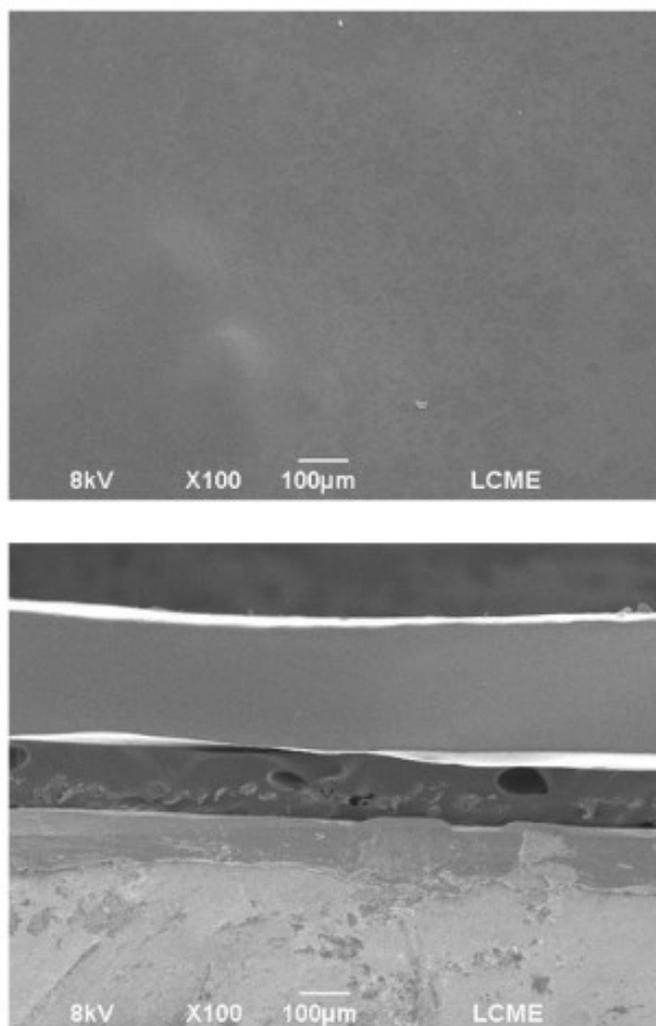
Anexo 5. Espectro de ^1H NMR para o BE50 em acetona deuterada.

Anexo 6. Resultados para a solubilidade aparente para as amostras maceradas BL e BE e amostras BL e BE sem processamento prévio (BLSo, BESo) em tampão PBS.

Amostra	Concentração de BNZ (mg mL⁻¹)
BLMa10	0,410 ± 0,016
BLMa30	0,324 ± 0,012
BLMa50	0,296 ± 0,009
BLMa70	0,251 ± 0,013
BLMa90	0,261 ± 0,006
BEMa10	0,373 ± 0,008
BEMa30	0,323 ± 0,013
BEMa50	0,240 ± 0,019
BEMa70	0,257 ± 0,006
BEMa90	0,239 ± 0,002
BLSo10	0,266 ± 0,002
BLSo30	0,362 ± 0,014
BLSo50	0,346 ± 0,002
BLSo70	0,283 ± 0,008
BLSo90	0,256 ± 0,014
BESo10	0,263 ± 0,008
BESo30	0,302 ± 0,012
BESo50	0,326 ± 0,009
BESo70	0,268 ± 0,013
BESo90	0,226 ± 0,004
BNZ	0,221 ± 0,004



Anexo 7. Curva de DSC para o LA puro.



Anexo 8. Imagem de microscopia para o filme de QTS, superfície e fratura.