

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

KELLY SUELY GALHARDO

**Desenvolvimento e análise de um material contendo quitosana para utilização
na liberação controlada de fármacos**

São Carlos

2021

KELLY SUELY GALHARDO

Desenvolvimento e análise de um material contendo quitosana para utilização na liberação controlada de fármacos

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado.

São Carlos

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: Kelly Suely Galhardo
Data: 28/07/2021

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Galhardo, Kelly Suely

Desenvolvimento e análise de um material contendo quitosana para utilização na liberação controlada de fármacos / Kelly Suely Galhardo. — São Carlos, 2021.
102 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

1. Quitosana. 2. Hidroclorotiazida. 3. Liberação controlada. I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8



AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meu amor Leonardo que sempre esteve ao meu lado, apoiando e incentivando meus passos.

À minha tia Áurea e minhas primas Tabata, Joyce e Ingritty que foram muito importantes nos momentos em que fiquei sozinha em São Carlos, por todo carinho, amor e apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado pelos anos de convivência, apoio, oportunidades e exemplos.

Ao Sr. João Tiengo e ao Dr. Marcelo Calegari pelo profissionalismo, pelas conversas, auxílios na elaboração de experimentos e pela amizade.

Aos meus colegas do GMEME: Lucas Martoni, Nathalia, Letícia, Thiago Prado, Thiago Serafim, Naiza, Camila, Lucas Catunda, Raphael, Higor, Fernando, Paulo e Lívia pelas contribuições científicas, amizades e pelos momentos de descontração na copa.

Ao Tony que me ajudou bastante na elaboração do artigo que publicamos em conjunto com o Prof. Dr. Ricardo J.N. Bettencourt da Silva de Portugal.

Aos meus amigos queridos Alana e Ulisses que me apoiaram e me ajudaram nos momentos difíceis.

Aos amigos Mathias e Mariana do curso de Licenciatura em Ciências Exatas por todo carinho, amizade, risos e apoio.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana-Filho e aos seus orientados Danilo e Filipe por fornecerem as quitosanas e pelo auxílio na caracterização das amostras.

A todos os funcionários do IQSC que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho.

À Capes e a Fapesp pelo apoio financeiro.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.”

FREIRE, 2002.

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de liberação controlada do fármaco hidroclorotiazida (HCTZ) a partir do método conhecido como gelificação iônica, no qual quantidade apropriada de tripolifosfato de sódio (TPP) é gotejada na solução contendo quitosana e o medicamento, em vazão constante. Para tanto, utilizamos 3 tipos de quitosana (comercial, de alta massa molar e quaternizada).

As amostras contendo quitosana quaternizada (CS_{quat}) foram as que apresentaram melhores resultados, sendo que a amostra 2:1 de CS_{quat} /TPP denotou 22% de encapsulamento e 18% de porcentagem de liberação cumulativa em tampão Britton-Robinson pH7 e 9% em pH 2. O sistema obtido foi analisado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de absorção na região do UV-vis.

A fim de determinar o fármaco liberado por métodos eletroquímicos, realizamos a modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de parede múltipla modificados com nanopartículas de ouro (GC/MWCNTsf/Au). Com este eletrodo avançado, fizemos sua caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de Raio-X, impedância, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial (DPV). Este material foi usado para determinar a quantidade de fármaco HCTZ liberado em função do pH.

ABSTRACT

In this work, a controlled release system for the drug hydrochlorothiazide (HCTZ) was developed using the method known as ionic gelation, in which an appropriate amount of sodium tripolyphosphate (TPP) is dropped into the solution containing chitosan and the drug, at a constant flow rate. For that, we use 3 types of chitosan (commercial, high molar mass and quaternized).

The samples containing quaternized chitosan (CS_{quat}) showed the best results, with the 2:1 CS_{quat} /TPP sample showing 22% encapsulation and 18% cumulative release percentage in Britton-Robinson pH7 buffer and 9% in pH 2. The system obtained was analyzed by absorption spectroscopy in the infrared region with Fourier transform (FTIR) and absorption spectroscopy in the UV-vis region.

In order to determine the drug released by electrochemical methods, we performed the surface modification of the glassy carbon electrode with multi-wall carbon nanotubes modified with gold nanoparticles (GC/MWCNTsf/Au). With this advanced electrode, we performed its characterization by transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction, impedance, cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry (DPV). This material was used to determine the amount of HCTZ drug released as a function of pH.

Lista de Figuras

Figura 1 - Comparação entre: (A) Liberação controlada e (B) Terapia convencional com 4 comprimidos por dia.....	15
Figura 2- Vantagens da liberação controlada de fármacos.....	16
Figura 3 - Esquema representativo das principais formas de incorporação do fármaco para sistema de liberação controlada.....	17
Figura 4- Sistema digestivo e variação de pH.....	19
Figura 5 - Estrutura molecular de diuréticos tiazídicos.....	20
Figura 6 - Representação estrutural da quitina e da quitosana.....	22
Figura 7 - Solubilidade da Quitosana em relação ao pH.....	23
Figura 8 - Diferentes métodos de preparação de materiais com quitosana.....	24
Figura 9 - Estrutura formada entre a Quitosana e o Tripolifosfato de Sódio.....	27
Figura 10 - Estrutura da quitosana apontando o grupo metila da unidade acetilada (círculo vermelho) e correspondente a numeração dos carbonos.....	40
Figura 11 - Titulador automático.....	42
Figura 12 - Imagem do sistema utilizado na liberação controlada (A) Saco de diálise mergulhado em solução tampão; (B) Sistema usado na liberação por controle eletroquímico com cela termostatizada a 37°C; (C) Detalhe do saco de diálise contendo o analito.....	44
Figura 13 - Espectro na região do UV-vis das nanopartículas de ouro em água.....	45
Figura 14 - Solução contendo as nanopartículas de ouro: (A) Método de Martin (100 µL de AuCl ₄ ⁻ / H ⁺ e 300 µL de BH ₄ ⁻ / OH ⁻); (B) Adaptado (300 µL de AuCl ₄ ⁻ / H ⁺ e 300 µL de BH ₄ ⁻ / OH ⁻) e (C) Adaptado MWCNTsf/Au (300 µL de AuCl ₄ ⁻ / H ⁺ ; 300 µL de BH ₄ ⁻ / OH ⁻ e 5 mg MWCNTsf).....	47
Figura 15 - Difractograma de Raio-X (A) MWCNTs e (B) MWCNTsf/Au.....	48
Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão para: (A) nanopartículas de ouro (Au) e (B) nanotubos de carbono de parede múltiplas recobertos com nanopartículas de ouro (MWCNTsf/Au).....	49
Figura 17 - Imagens de microscopia óptica do eletrodo de carbono vítreo (A,B) e do eletrodo modificado GC/MWCNTsf/Au (C,D).....	50
Figura 18 - AFM do eletrodo de carbono vítreo: (A) e (B) GC sem modificação; (C) e (D) GC/MWCNTsf/Au.....	51
Figura 19 - AFM do MWCNTsf/Au em superfície de mica.....	52
Figura 20 - Impedância eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo: (preto) limpo apenas com alumina, (vermelho) limpo com alumina seguida de limpeza eletroquímica em H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ e (azul) limpo com alumina seguida de limpeza eletroquímica em NaOH 0,05 mol L ⁻¹	53
Figura 21 - Impedância eletroquímica para o eletrodo de carbono vítreo sem modificação (preto), modificado com MWCNTs (vermelho) e MWCNTs/Au (azul) na presença de 50 mmol L ⁻¹ do par redox [Fe(CN) ₆] ^{2+/3+} em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹	55
Figura 22 - Voltametria cíclica a 0,50 V s ⁻¹ para os eletrodos de carbono vítreo sem modificação [limpeza apenas com alumina (preto), limpeza com alumina seguida de limpeza eletroquímica em NaOH 0,05molL ⁻¹ (vermelho)], modificado com MWCNTs (azul) e MWCNTs/Au (verde) na presença de 50 mmol L ⁻¹ do par redox [Fe(CN) ₆] ^{2+/3+} em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹	56
Figura 23 - Voltametria cíclica em H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ a 50 mV s ⁻¹ do eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs/Au.....	58

Figura 24 - Voltametria cíclica a 50 mV s ⁻¹ na presença de 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de HCTZ do eletrodo de carbono vítreo (GC) sem modificação (preto), modificado com MWCNTs (vermelho) e modificado com MWCNTs/Au (azul), em (A) pH 2 e (B) pH 7.....	59
Figura 25 - Esquema que mostra a variação da estrutura da HCTZ de acordo com seu pKa..	59
Figura 26 - Comportamento eletroquímico da HCTZ de acordo com a variação do pH para o eletrodo modificado com GC/MWCNTsf/Au em solução contendo 1 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de HCTZ, cela termostatzada a 37°C: (A) DPV; (B) Gráfico de ipa vs pH; (C) Gráfico de Epa vs pH.....	60
Figura 27 - Esquema do mecanismo de eletrooxidação proposto para a hidroclorotiazida....	61
Figura 28 - Variação da velocidade de varredura na voltametria cíclica do eletrodo GC/MWCNTsf/Au em solução 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de HCTZ: (A) pH 2 e (B) pH 7.....	62
Figura 29 - Gráfico de ipa vs v e ipa vs v ^{1/2} para eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTsf/Au na presença de 1 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de HCTZ: (A) e (B) pH 2; (C) e (D) pH 7. 63	63
Figura 30- Determinação da curva analítica por Voltametria de Pulso Diferencial em tampão Britton-Robinson pH 2 a 37°C: (A) GC; (B) GC/MWCNTsf/Au; (C) curva analítica.....	64
Figura 31 - Determinação da Curva Analítica por Voltametria de Pulso Diferencial em tampão Britton-Robinson pH 7 a 37°C: (A) GC; (B) GC/MWCNTsf/Au; (C) Curva analítica.	65
Figura 32 - Curva analítica determinada por Espectroscopia de Absorção no UV-vis a 37 °C em tampão Britton-Robinson: (A e B) pH 2 e (C e D) pH7. A concentração de HCTZ variou de 1 x 10 ⁻⁵ a 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ : (preto) medida do branco; (vermelho) 1 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de HCTZ; (verde) 1 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de HCTZ; (azul) 2 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de HCTZ e (magenta) 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	67
Figura 33 - Difratoograma de raio-X da quitosana comercial sem purificação (preto) e purificada (vermelho).....	68
Figura 34 - 1H RMN da quitosana comercial purificada.....	69
Figura 35 - 1H RMN da quitosana de alta massa molar.....	70
Figura 36 - Espectros de FTIR para: (A) hidroclorotiazida (HCTZ) e (B) tripolifosfato de sódio (TPP).....	73
Figura 37 - Espectros de FTIR referentes à: (A) quitosana comercial purificada (CScom); (B) quitosana com alta massa molar (CSmod); (C) quitosana quaternizada (CSquat).....	74
Figura 38 - Espectros de FTIR do sistema contendo 10 mL de quitosana; 4,5 mg de HCTZ e 4 mL de TPP: (A) CScom, (B) CSmod e (C) CSquat.....	75
Figura 39 - Espectros de absorção no UV-vis dos componentes do sistema de liberação controlada de hidroclorotiazida.....	77
Figura 40 - Espectros de UV-vis em função do tempo: (A) 10 mL de solução de quitosana comercial purificada, 4,5 mg de hidroclorotiazida e 4 mL de tripolifosfato e (B) 10 mL de solução de quitosana comercial purificada e 4 mL de tripolifosfato.....	78
Figura 41 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado com diferentes quantidades de tripolifosfato (1, 2, 4 e 6 mL). (A) Quitosana comercial purificada e (B) quitosana de alta massa molar. Gotejamento do TPP a 1 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda fixo em 271 nm.....	79
Figura 42 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado com diferentes quantidades de quitosana (25, 50 e 100%), todas com 2 mL de TPP. (A) Quitosana comercial purificada e (B) quitosana de alta massa molar. Gotejamento do TPP a 1 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda fixo em 271 nm.....	80

Figura 43 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado com diferentes quitosanas (CScom; CSmod e CSquat), todas com 4 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda fixo em 271 nm.....	81
Figura 44 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado com quitosana quaternizada (CSquat), todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda fixo em 271 nm.....	82
Figura 45 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado com quitosana de alta massa molar (CSmod), todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda fixo em 271 nm.....	83
Figura 46 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado para CSquat e CSmod, todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda fixo em 271 nm.....	84
Figura 47 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado para CSquat e CSmod, todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min ⁻¹ . Comprimento de onda fixo em 271 nm.....	85
Figura 48 - Gráfico comparando as detecções por DPV em eletrodo modificado (GC/MWCNTsf/Au) e eletrodo limpo (GC). Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, amostra contendo 1:1 de CSquat / TPP.....	89
Figura 49 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado para CSquat e CSmod, todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min ⁻¹ . Detecção por DPV usando GC sem modificação.....	90
Figura 50 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado para CSquat e CSmod, todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min ⁻¹ . Detecção por DPV usando GC sem modificação.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1- Propriedades físico-químicas da hidroclorotiazida.....	20
Tabela 2- Relação de reagentes utilizados.....	35
Tabela 3- Concentrações usadas na preparação dos tampões Britton-Robinson.....	39
Tabela 4- Preparação das amostras de encapsulamento de hidroclorotiazida (HCTZ) usando quitosana (CS) e tripolifosfato de sódio (TPP).....	42
Tabela 5- Composição das nanopartículas de ouro e o comprimento de onda da banda plasmônica.....	46
Tabela 6- Parâmetros voltamétricos do par redox $[Fe(CN)_6]^{2+/3+}$ para os diferentes eletrodos de trabalho (GC; GC/MWCNTs e GC/MWCNTs/Au).....	57
Tabela 7- Parâmetros analíticos obtidos com eletrodo sem modificação (GC) e com o eletrodo modificado (GC/MWCNTsf/Au).....	66
Tabela 8- Dados experimentais das Quitosanas comercial, com alta massa molar e quaternizada.....	71
Tabela 9- Cálculo da quantidade encapsulada de HCTZ.....	83
Tabela 10- Porcentagem de liberação cumulativa nas amostras de CSquat e CSmod para 50h de liberação em pH 7 e pH 2, comparadas com a quantidade encapsulada em cada amostra.	86
Tabela 11- Comparação das porcentagens de liberação cumulativa de sistemas de liberação de fármacos.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Au: Nanopartículas de Ouro;
CS: Quitosana;
CS_{com}: Quitosana Comercial;
CS_{mod}: Quitosana com Alta Massa Molar;
CS_{quat}: Quitosana Quaternizada;
DPV: Voltametria de Pulso Diferencial;
FTIR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier;
GC: Carbono Vítreo;
GlcN: 2-amino-2desoxi-D-glicose;
GlcNAc: 2 acetamida-2-desoxi-D-glicose;
h: hora;
¹H RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;
HCTZ: Hidroclorotiazida;
MWCNTs: Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas;
TPP: Tripolifosfato de Sódio;
UV-vis: Espectroscopia no Ultravioleta Visível.

SUMÁRIO

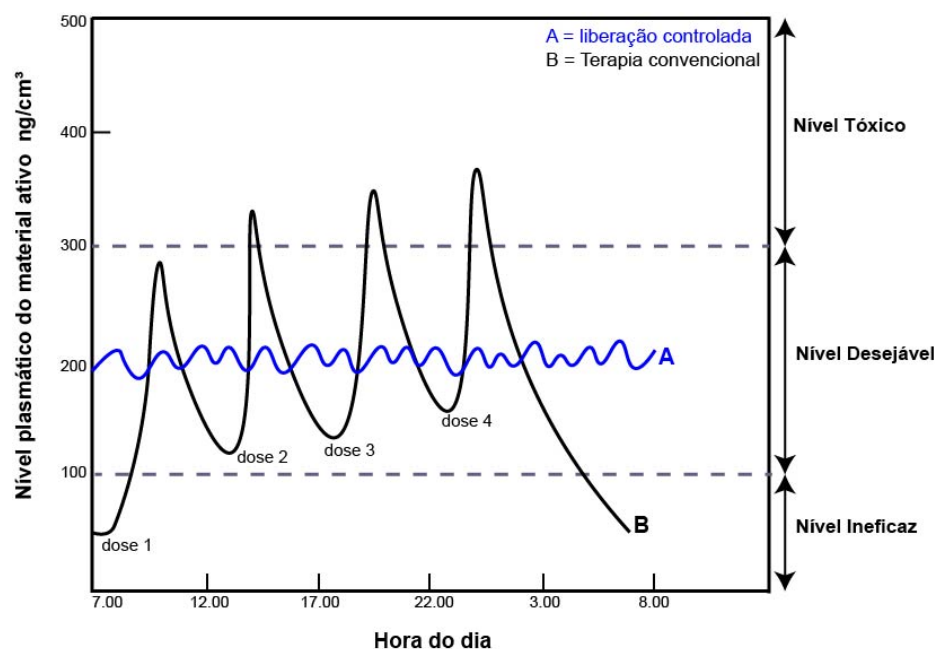
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Hidroclorotiazida.....	19
1.2 Quitosana.....	21
1.2.1 Gelificação iônica.....	25
Estado da Arte.....	28
2 OBJETIVO.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Reagentes.....	35
3.3 Procedimento experimental.....	36
3.3.1 Obtenção das nanopartículas de ouro.....	36
3.3.2 Incorporação das nanopartículas de ouro aos nanotubos de carbono.....	36
3.3.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo.....	37
3.3.4 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro.....	37
3.3.5 Caracterização morfológica.....	38
3.3.6 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado.....	38
3.3.7 Comportamento eletroquímico da hidroclorotiazida.....	38
3.3.8 Determinação da hidroclorotiazida por UV-vis.....	39
3.3.9 Caracterização da Quitosana.....	39
3.3.10 Encapsulamento da hidroclorotiazida.....	41
3.3.11 Testes de liberação.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Caracterização do nanomaterial.....	45
4.1.1 Caracterização morfológica das nanopartículas de ouro e dos nanotubos de carbono.....	45
4.1.2 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado.....	52
4.1.2.1 Limpeza do eletrodo.....	52
4.1.2.2 Modificação do eletrodo.....	55
4.2 Comportamento eletroquímico da hidroclorotiazida.....	58
4.3 Determinação da hidroclorotiazida por DPV.....	63
4.4 Determinação da hidroclorotiazida por UV-vis.....	66
4.5 Caracterização da Quitosana.....	68

4.6 Otimização do sistema de liberação controlada.....	72
4.6.1 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	72
4.6.2 Detecção da liberação por UV-vis.....	77
4.6.3 Detecção da liberação por DPV.....	87
5 CONCLUSÃO.....	92
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

A ingestão de medicamentos na terapia convencional resulta, instantaneamente, em um nível plasmático elevado da droga, acima do qual os efeitos tóxicos se tornam aparentes. Entretanto, com o passar do tempo, até a ingestão de nova dose, o nível pode descer a valores muito baixos, no qual o fármaco torna-se ineficaz. A grande variação está representada pelo esquema da Figura 1 (GRAHAM, 1978). Nos métodos convencionais, a liberação do fármaco ocorre rapidamente, a concentração do medicamento na corrente sanguínea aumenta até atingir um nível máximo e depois decai, sendo então necessário outra dose para que os níveis de concentração sejam mantidos. Apenas uma pequena fração da dose atinge o local desejado, a maior parte é perdida, sendo distribuída em outros tecidos e órgãos, na metabolização ou excretada antes de atingir o local de ação.

Figura 1 - Comparação entre: (A) Liberação controlada e (B) Terapia convencional com 4 comprimidos por dia.



Fonte: Adaptado de GRAHAM, 1978.

Algumas desvantagens que podemos destacar com relação a terapia convencional são: baixa solubilidade de alguns medicamentos em água, não especificidade, toxicidade sistêmica, baixo índice terapêutico, alta dose de

medicamento, suscetível à degradação fisiológica e a necessidade de administração repetida.

Por outro lado, quando a ingestão de fármacos ocorre com um dispositivo de liberação controlada, o nível do agente ativo no plasma atinge um valor apropriado para o tratamento, que é mantido pelo intervalo de tempo até a ingestão da nova dose, evitando os níveis tóxico e nível ineficaz do caso anterior. É possível um controle temporal e espacial, através da associação química ou física dos fármacos com materiais biocompatíveis capazes de controlar a taxa de liberação e a condução ao sítio específico.

A Figura 2 mostra as vantagens de se utilizar a liberação controlada de fármacos. O aumento da localização específica melhora a eficácia do tratamento e diminui efeitos adversos. Por exemplo, no tratamento de tumores, o acúmulo de fármaco na região do tumor diminui a distribuição do fármaco para outros órgãos o que faz com que os efeitos colaterais diminuam significativamente (BAHRAMI *et al.*, 2017).

Figura 2- Vantagens da liberação controlada de fármacos.

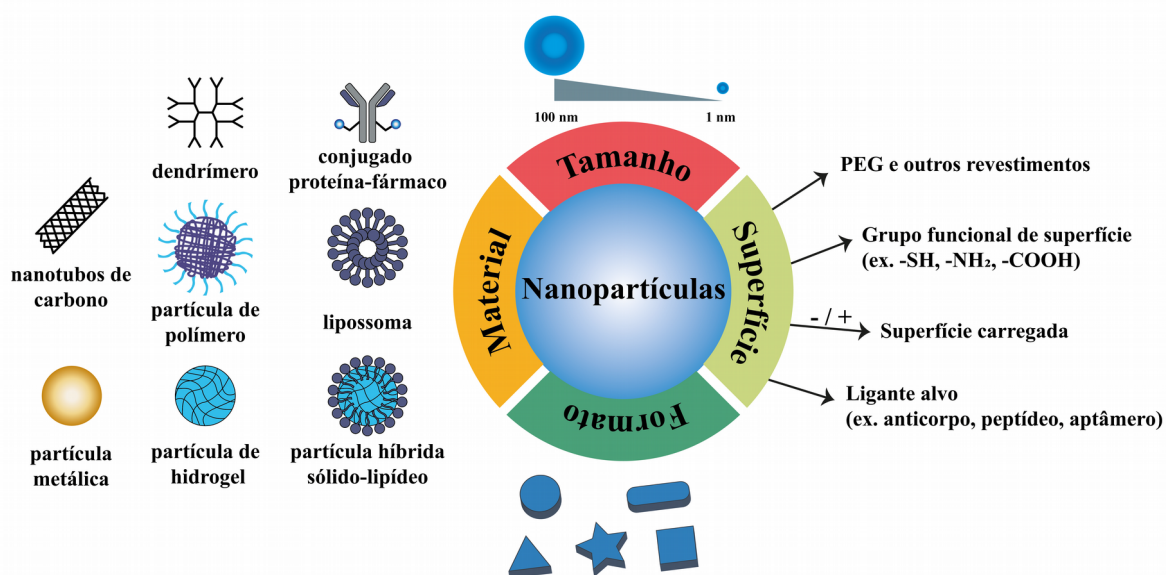


Fonte: Autoria própria.

Diversas maneiras têm sido utilizadas para incorporação de fármacos em sistemas de liberação controlada (KUMAR *et al.*, 2017), a Figura 3 mostra um esquema das principais formas.

Os dendrímeros são polímeros sintéticos com arquiteturas tridimensionais, altamente ramificadas e bem definidas. O termo *dendrimer* é derivado da palavra grega “*Dendron*”, que significa “árvore”. Um dendrímero típico é constituído em três partes: (a) um núcleo central com dois ou mais grupos reativos; (b) camadas interiores compostas de unidades de ramificação repetidas ligadas covalentemente ao núcleo; (c) grupos funcionais terminais na superfície externa. As moléculas de fármaco podem ser fisicamente encapsuladas nas cavidades internas dos dendrímeros ou quimicamente conjugadas com os grupos funcionais terminais. A maioria dos dendrímeros é não degradável em ambiente fisiológico, o que resulta em sérios efeitos colaterais induzidos pelo acúmulo de macromoléculas artificiais não degradáveis dentro das células ou nos tecidos. Para suprir esta limitação têm sido elaborado pesquisas na área de desenvolvimento de dendrímeros biodegradáveis (HUANG, WU, 2018; MONTANARI *et al.*, 1998).

Figura 3 - Esquema representativo das principais formas de incorporação do fármaco para sistema de liberação controlada.



Fonte: Adaptado de <https://www.youtube.com/watch?v=TDvhVSXnjw> acessado em 04/06/2018.

Os hidrogéis são uma classe especial de polímeros que podem absorver e reter uma grande quantidade de água, mantendo sua integridade tridimensional. Podem ser sensíveis às substâncias químicas, mudanças de temperatura, pH, luz, pressão, campo elétrico dentre outros. Os hidrogéis podem ser formados por reticulação química (ligações covalentes) ou junções físicas (interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, emaranhamento de cadeias etc.). Têm sido muito usados em aplicações biomédicas, incluindo liberação controlada de fármacos, encapsulamento celular e engenharia de tecidos (GONG *et al.*, 2013).

Os lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou hidrofóbicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas. Como por exemplo, tratamento do câncer, desenvolvimento de vacinas, terapia gênica, terapia de doenças infecciosas e parasitoses, liberação controlada de fármacos em doenças cardiovasculares, liberação controlada de insulina, dentre outras (BATISTA *et al.*, 2007; DIMER *et al.*, 2013).

Os sistemas poliméricos de liberação controlada representam uma boa estratégia para incorporação de substâncias, oferecem várias vantagens: (1) a capacidade para alcançar altas cargas de drogas, (2) melhor solubilidade da droga, (3) modulação da farmacocinética do fármaco (incluindo exposição prolongada ao plasma e comportamento otimizado de biodistribuição, resultando em maior eficácia terapêutica), (4) efeitos colaterais sistêmicos e locais reduzidos como resultado de drogas altamente irritantes ou citotóxicas, (5) maior estabilidade do fármaco in vivo e (6) taxa controlada e local de liberação do fármaco (MARASINI, HAQUE, KAMINSKAS, 2017; MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISARI, 2010).

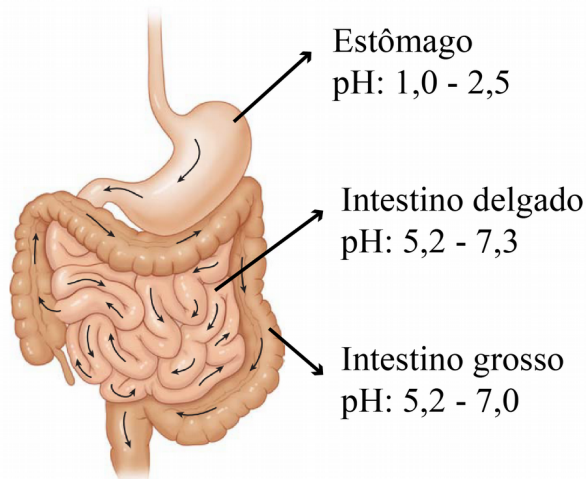
As ciclodextrinas são oligômeros cíclicos com estrutura toroidal e frequentemente usadas para aumentar a solubilidade aquosa, a estabilidade físico-química e fisiológica e a capacidade de entrega de vários fármacos ativos. Possuem quatro propriedades importantes. Primeiro são capazes de proteger o medicamento de interações específicas e não específicas nos meios fisiológicos. Em segundo

lugar, podem interagir e desestabilizar as membranas biológicas para aumentar a permeabilidade ao medicamento. Em terceiro lugar, têm a capacidade de modular a taxa e o local de liberação do medicamento, e por fim, em quarto, são geralmente reconhecidos como seguros (ADEOYE, CARBRAL-MARQUES, 2017).

Os sistemas de liberação controlada podem ser associados à mudança de forma do agente portador por meio de inchaço ou degradação para liberação do fármaco, com base nas alterações de características da unidade de micro / nanoformulação individual. Além disso, a liberação pode ocorrer por diversos estímulos: pH, enzima, luz, temperatura, reação redox e força mecânica (HU, CHEN, GU, 2018).

Importante notar que o pH do sistema gastrointestinal é diferente dependendo da região, a Figura 4 mostra a variação do pH do estômago (1,0 – 2,5), do intestino delgado (5,2 – 7,3) e do intestino grosso (5,2 – 7,0). Estes dados devem ser levados em consideração quando se pensa em um sistema de liberação controlada de fármaco, pois queremos que a liberação aconteça no local adequado.

Figura 4- Sistema digestivo e variação de pH.



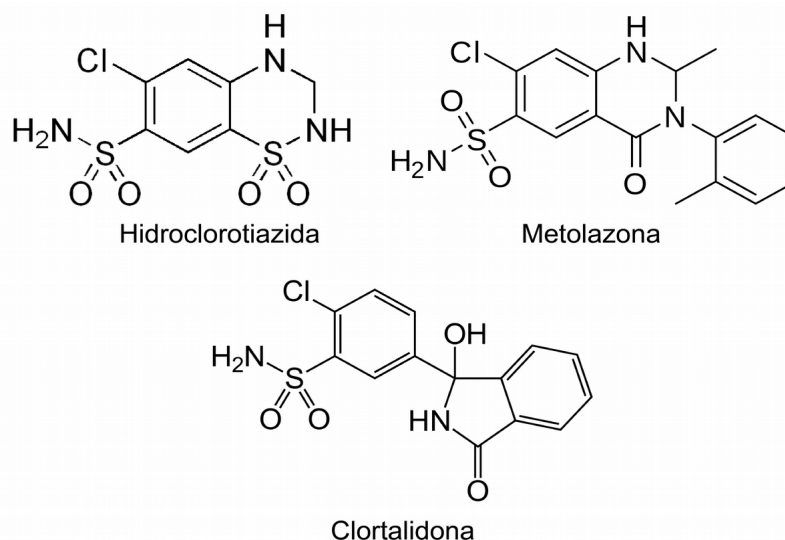
Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2017.

1.1 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (HCTZ) é uma droga diurética da classe das tiazidas (Figura 5), que age inibindo a habilidade dos rins de reter água. Sua ação consiste na redução do volume de sangue, diminuindo o retorno sanguíneo para o coração e

consequentemente à redução do débito cardíaco (volume de sangue sendo bombeado pelo coração em um minuto). É frequentemente usada no tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, edema sintomático, diabetes insípido, acidose tubular renal e prevenção de cálculos renais em pessoas com elevada concentração de cálcio na urina (ALGHAMDI, 2014; BATLOUNI, 2009).

Figura 5 - Estrutura molecular de diuréticos tiazídicos.



Fonte: Wikipedia. (<https://pt.wikipedia.org/wiki/Hidroclorotiazida> ; <https://en.wikipedia.org/wiki/Metolazone> ; <https://en.wikipedia.org/wiki/Chlortalidone>)

A HCTZ é termicamente estável até 260 °C, sua decomposição térmica ocorre entre 260 e 680°C (VALLADAO *et al.* 1996; DEPPELER, 1981). A Tabela 1 mostra algumas propriedades físico-químicas da HCTZ.

Tabela 1- Propriedades físico-químicas da hidroclorotiazida.

Propriedades	
Massa molar	297,7 g mol ⁻¹
Densidade	1,68 g cm ⁻³
Solubilidade em água a 25°C	0,609 mg mL ⁻¹
Solubilidade em água a 37°C	1,08 mg mL ⁻¹
pKa ₁	7,9
pKa ₂	9,2
Pressão de vapor a 25°C	1,78 x 10 ⁻¹⁰ mmHg

Fonte: DEPPELER, 1981; PubChem, 2019.

Importante pontuar que a HCTZ atua nos rins e que a formação da urina ocorre nos néfrons que estão localizados em nossos rins. Cada um dos cerca de 1 milhão de néfrons de cada rim é dividido em segmentos, e cada segmento é intimamente associado com vasos sanguíneos especializados. (SILVERTHORN, 2017).

Embora os rins colaborem com apenas 0,4% do peso total do corpo (120 a 170 gramas cada), eles recebem de 20 a 25% do débito cardíaco. Esse alto fluxo sanguíneo é crítico para a função renal (SILVERTHORN, 2017).

A ação da hidroclorotiazida sobre os rins é direta, atuando no mecanismo de reabsorção de eletrólitos no túbulo distal, ocasionando o aumento da excreção de sódio, cloreto e conseqüentemente de água (HIDROCLOROTIAZIDA, Bula de remédio).

Além do efeito diurético a hidroclorotiazida como outros tiazídicos, apresenta leve efeito anti-hipertensivo. O mecanismo da ação anti-hipertensiva dos tiazídicos pode ser relacionado com a excreção e redistribuição do sódio. A hidroclorotiazida não altera a pressão arterial normal. A HCTZ é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, quando administrada em conjunto com a ingestão de alimentos sua absorção aumenta (HIDROCLOROTIAZIDA, Bula de remédio).

A hidroclorotiazida não sofre metabolismo. Sua meia-vida plasmática é bifásica, sendo a fase inicial de 3 a 4 horas e a meia-vida terminal de 10 a 17 horas. O início de ação ocorre 2 horas após sua administração, sendo de 1 a 2 ½ horas, após administração oral, o tempo de atingimento da concentração máxima plasmática (HIDROCLOROTIAZIDA, Bula de remédio).

A ação da hidroclorotiazida persiste por aproximadamente 6 a 12 horas. É excretada rapidamente pelos rins, após a administração de 25 a 100 mg, por via oral, cerca de 72 a 97% da dose são excretados na urina (HIDROCLOROTIAZIDA, Bula de remédio).

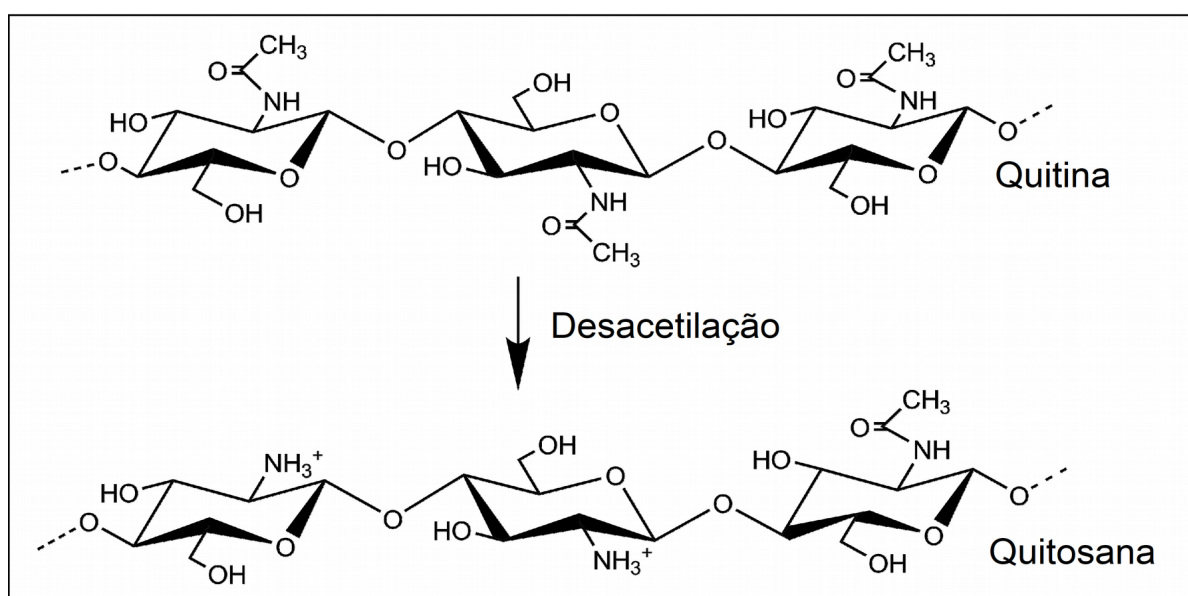
1.2 Quitosana

A quitosana é um material orgânico biocompatível, biodegradável, com baixa toxicidade e com atividade biológica versátil como atividade antimicrobiana e baixa

imunogenicidade (DASH *et al.*, 2011), é usada com frequência em diversas aplicações, inclusive na área farmacêutica (AHSAN *et al.*, 2018).

A Figura 6 mostra um esquema da reação química de obtenção da quitosana, que é feita a partir da desacetilação da quitina, presente em exoesqueleto de crustáceos e artrópodes. A quitosana é constituída por um polímero linear de 2 acetamida-2-desoxi-D-glicose (a unidade neutra GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicose (a unidade carregada positivamente GlcN).

Figura 6 - Representação estrutural da quitina e da quitosana.

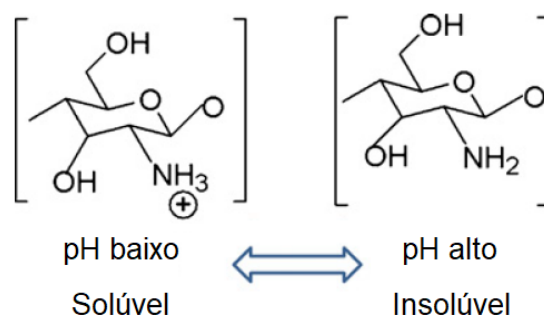


Fonte: Adaptado de NYGAARD *et al.*, 2015.

A massa molar média e o grau de acetilação são as duas principais propriedades da quitosana, que afetam seu uso como molécula da matriz para a administração de fármacos. Essas propriedades afetam sua solubilidade e hidrofobicidade aquosa, alterando assim sua eficiência de encapsulamento do medicamento. A quitosana é moderadamente solúvel em solventes aquosos em condições neutras. Sua solubilidade, no entanto, aumenta sob condições ácidas, em grande parte devido à protonação dos grupos amino (Figura 7). Além disso, exibe uma variedade de características que aumentam sua utilidade como veículo de administração de medicamentos (AHSAN *et al.* 2018).

A quitosana é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos limitando seu uso no encapsulamento e administração de drogas hidrofóbicas. Muitos derivados da quitosana foram desenvolvidos para aumentar a eficiência de encapsulação de drogas hidrofóbicas (AHSAN *et al.*, 2018). Vários métodos foram adotados para a solubilização de quitosana: quaternização (MURATA, OHYA, OUCHI, 1996), alquilação (SASHIWA, SHIGEMASA, 1999; YANG, CHOU, LI, 2002), acetilação (SASHIWA, SHIGEMASA, 1999; KUBOTA *et al.*, 2000; SORLIER *et al.*, 2001), carboximetilação (MUZZARELLI *et al.*, 1982), conjugação de óxido de polietileno (SUGIMOTO *et al.*, 1998), formação de combinações de quitosana / sal de polioli (CHENITE *et al.*, 2000), geração de N-trimetil quitosana (SIEVAL *et al.*, 1998; BRITTO, CAMPANA-FILHO, ASSIS, 2005), derivados de N-carboximetilquitosana solúveis em água (AN *et al.*, 2009), dentre outras.

Figura 7 - Solubilidade da Quitosana em relação ao pH.



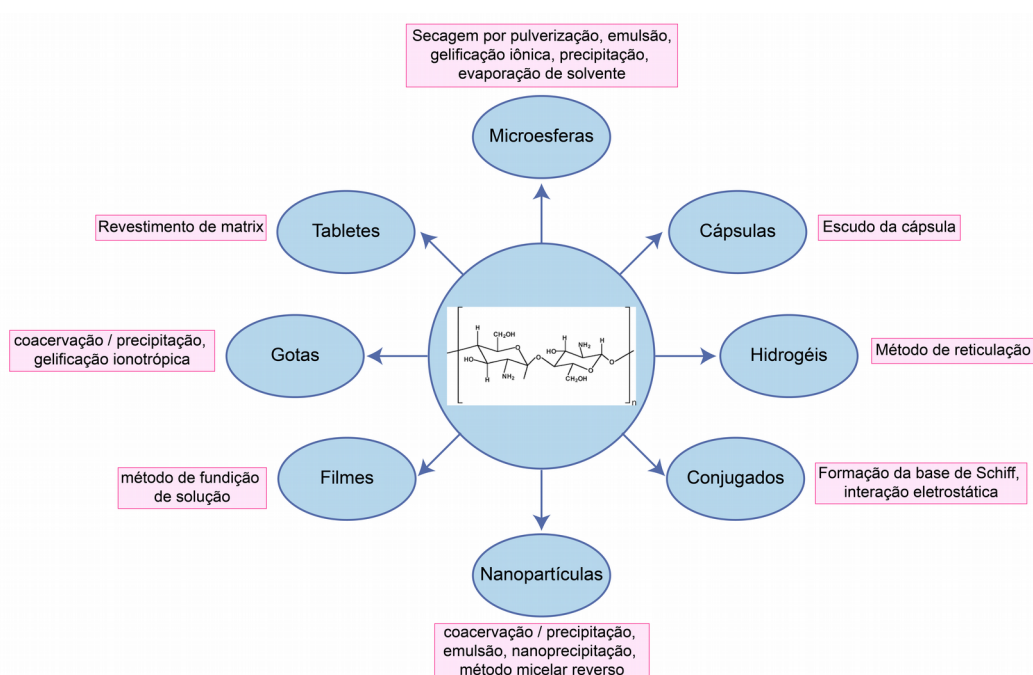
Fonte: Adaptado de DASH *et al.*, 2011.

Dependendo da função e da aplicação do transportador a quitosana pode ser usada de diversas formas. A Figura 8 representa várias formulações de materiais de quitosana em sistemas de liberação controlada de fármacos e outras aplicações biomédicas, junto a seus métodos de preparação. Diversos fatores devem ser levados em conta ao selecionar o método de preparação, como estabilidade química e térmica dos agentes bioativos, tamanho das partículas, toxicidade residual dos produtos finais, a cinética de liberação e os tipos de sistema de entrega (ALI, AHMEDB, 2018).

Com relação aos sistemas de liberação controlada, neste trabalho se destacam 4 métodos de preparação, ou seja, microesferas, nanopartículas, filmes e hidrogéis.

A utilização de microesferas de quitosana na liberação controlada permite o controle do perfil de liberação e do sítio ativo específico. Diferentes métodos são usados para a formação das microesferas: interação de contra-íons com ânions (sulfato, fosfatos, hidróxidos); reticulação; evaporação de solvente, gelificação iônica; spray drying; polimerização em emulsão; precipitação / coacervação etc. (ALI, AHMEDB, 2018).

Figura 8 - Diferentes métodos de preparação de materiais com quitosana.



Fonte: Adaptado de ALI, AHMEDB, 2018.

As nanopartículas de quitosana estão atuando como um excelente transportador de medicamentos devido a algumas propriedades benéficas intrínsecas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, bioatividade e, em certa medida, alvo específico desencadeado por seu caráter catiônico. Vários métodos estão sendo relatados para a preparação de nanopartículas de quitosana, como emulsão, coacervação ou precipitação, gelificação iônica, método micelar reverso, método de peneiração e

nanoprecipitação etc. As nanopartículas impedem a degradação enzimática de drogas lábeis no trato gastrointestinal (ALI, AHMEDB, 2018).

A formação de membranas transparentes e flexíveis à base de quitosana podem ser obtidas pelo método de fundição de solução. A adição de glicerina pode melhorar as propriedades mecânicas agindo como plastificante. Com o aumento do teor de glicerol, a resistência à tração, a taxa de intumescimento, a permeabilidade ao vapor de água e a molhabilidade das membranas são significativamente melhoradas (MA *et al.*, 2017).

Os hidrogéis são redes poliméricas reticulares tridimensionais que têm a capacidade de absorver grandes quantidades de água devido às interações físicas e químicas entre as redes poliméricas. Os hidrogéis exibem a capacidade de transportar pequenas moléculas como fármacos. Hidrogéis totalmente inchados (ou seja, hidratados) possuem algumas características físicas comuns aos tecidos vivos, incluindo consistência emborrachada e macia, baixa tensão interfacial com água e fluidos biológicos. As propriedades físicas dos hidrogéis são reguladas pela massa molar média, grau de reticulação, cargas e associação. O aumento no grau de reticulação resulta em aumento da rigidez e dos módulos, o que foi importante para a proteção do fármaco encapsulado da deformação física durante o transporte e a migração do hidrogel. Outra propriedade importante é o tamanho do poro ou malha do hidrogel e o tamanho hidrodinâmico do medicamento, que controla a difusão do medicamento encapsulado (ALI, AHMEDB, 2018; DELMAR, BIANCO-PELED, 2016).

Como vimos anteriormente a quitosana tem sido usada de diversas maneiras em sistemas de liberação controlada de fármacos, sendo que um sistema relativamente simples é obtido pelo método de gelificação iônica. Este método é uma interação inter e intramolecular criada entre os grupos amina carregados positivamente da quitosana e o poliânion tripolifosfato que possui carga negativa (CALVO *et al.*, 1997).

1.2.1 Gelificação iônica

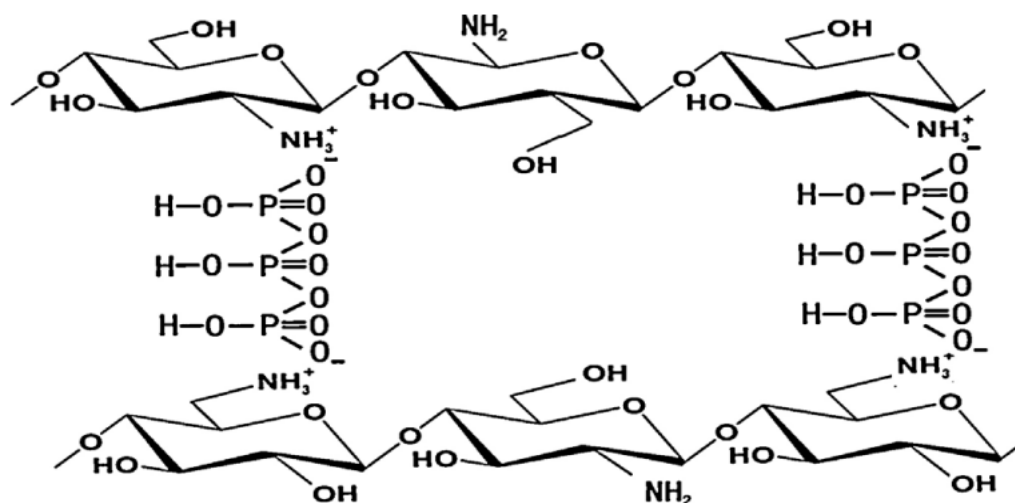
Partículas de quitosana/tripolifosfato (CS/TPP) reticuladas ionicamente têm sido estudadas para aplicação médica ou farmacêutica, especialmente como

carregadores em sistema de liberação controlada de medicamentos, principalmente por ser uma plataforma de fácil preparação, conveniente e controlável. Além disso, apresenta propriedades biológicas favoráveis, incluindo biocompatibilidade, biodisponibilidade e biodegradabilidade, bem como propriedades físico-químicas ajustáveis em termos de tamanho, densidade de carga superficial e capacidade de carga, tornam as partículas CS/TPP potencialmente úteis para aplicações clínicas, tanto para incorporação de medicamentos hidrofílicos quanto hidrofóbicos (MAZANCOVÁ, 2018; BUGNICOURT *et al.*, 2014).

Os complexos CS/TPP são formados via interações coulômbicas entre os grupos CS-NH₃⁺ positivo e TPP-O⁻ negativo, tornando as partículas CS/TPP intrinsecamente responsivas ao pH (Figura 9). A formação de complexos de polieletrólitos CS/TPP é governada pelo pH, que determina o grau de ionização (α) da quitosana e do TPP, afetando a quantidade de grupos CS-NH₃⁺ e TPP-O⁻ e, portanto, as interações eletrostáticas mútuas e a estequiometria da reticulação. Além disso, o pH define a conformação das cadeias de quitosana em solução, pela qual a disponibilidade dos grupos CS-NH₃⁺ para complexação subsequente com o agente de reticulação aniônica é alterada. Esses fenômenos foram bem estudados no pH em torno do pK_a da quitosana (tipicamente $\pm 6,5$), onde ocorre uma mudança repentina no valor de α e na conformação de estendida para bobina, e acima do qual a quitosana precipita da solução aquosa. Devido a essas principais restrições, as partículas CS/TPP são comumente preparadas sob condições ácidas, e as partículas exibem propriedades inerentemente diferentes, dependendo do pH (MAZANCOVÁ, 2018).

O pH e a força iônica das soluções de quitosana permitem ajustar as características da nanopartícula (tamanho, distribuição de tamanho e carga superficial), provavelmente devido à forte influência na conformação das cadeias poliméricas. Além disso, as variações na viscosidade (dependente da concentração e da massa molar média) da solução de quitosana também levam a mudanças significativas nas características das partículas (BUGNICOURT *et al.*, 2014; SIPOLI *et al.*, 2015; RAMPINO *et al.*, 2013; KOUKARAS *et al.*, 2012).

Figura 9 - Estrutura formada entre a Quitosana e o Tripolifosfato de Sódio.



Fonte: ZOU *et al.*, 2015.

A utilização da quitosana como meio de carregamento do fármaco hidroclorotiazida é pouco explorado e interessante, já que este medicamento, como foi dito, é utilizado em diversos tratamentos de uso contínuo. Neste caso, o controle da liberação pode ser ajustado *in vitro*, utilizando técnicas espectroscópicas e eletroquímicas para avaliar, com o tempo, a concentração do fármaco em estudo.

A detecção e quantificação de fármacos via eletroanálise é muito interessante devido à sua simplicidade, baixo custo e tempos de análise relativamente curtos, sem a necessidade de etapas de extrações demoradas (MOTOC *et al.*, 2013).

As técnicas de pulso têm como base a cronoamperometria, em que é medida a corrente elétrica em função do tempo de aplicação em um determinado pulso de potencial. A corrente tem características dependentes tanto da largura do pulso como do degrau de potencial aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico. A maneira como o pulso é aplicado define as características de cada técnica. A voltametria de pulso diferencial é aquela em que pulsos com amplitude igual são aplicados em uma rampa linear de potencial e a corrente é medida antes do pulso aplicado e no final do pulso. A subtração destes dois valores de correntes, sendo o primeiro associado apenas com a corrente capacitiva e o segundo com a faradaica, é representado contra o potencial da rampa linear de potencial, gerando o voltamograma de pulso diferencial (SOUZA *et al.*, 2003) (BARD; FAULKNER, 2001).

Portanto, as técnicas de pulso são muito adequadas para a avaliação da concentração de fármacos em solução, devido à minimização da contribuição capacitiva e da rapidez das medidas.

Estado da Arte

No Estado da Arte vamos relatar os principais trabalhos publicados com a hidroclorotiazida e com os sistemas de liberação controlada usando quitosana em sua composição.

KHADAM (*et al.*, 2011) investigaram a solubilização da hidroclorotiazida sob a influência de diferentes estímulos, tais como alterações de pH ou temperatura e concentrações variáveis de sal/copolímero. Os resultados obtidos mostraram que a solubilidade da HCTZ pode ser significativamente aumentada com a elevação da concentração do copolímero, da concentração de sal, da temperatura ou com a diminuição do pH para que o fármaco permaneça na forma não ionizada.

CHADHA (*et al.*, 2012) desenvolveram um sistema de nanopartículas de lecitina/quitosana carregadas com hidroclorotiazida e complexadas com β -ciclodextrina, com o objetivo de melhorar as propriedades biofarmacêuticas da molécula. Eles utilizaram o método de evaporação do solvente. Os autores conseguiram uma boa eficiência de encapsulamento e estudos *in vitro* mostraram um padrão de liberação melhorada e sustentada da HCTZ que é um medicamento pouco solúvel em água. Os estudos *in vivo* mostraram que as nanopartículas apresentaram melhor eficácia terapêutica do que a HCTZ comercial.

No trabalho de YADAV (*et al.*, 2014) a hidroclorotiazida foi auto-nanoemulsificada (SNEDDS) e estudos farmacodinâmicos *in vivo* foram realizados, observando-se que ocorreu um aumento notável na taxa de dissolução em comparação ao fármaco comercial. Os autores utilizaram as seguintes marcas comerciais: Capmul MCM (19,17% p / p), Tween 80 (57,5% p / p), Transcutol P (12,7% p / p) e HCTZ (4,17% p / p). Os efeitos farmacológicos do sistema desenvolvido foram analisados em ratos Wistar em comparação ao fármaco comercial. A biodisponibilidade do HCTZ melhorou, ocorreu aumento da taxa de

dissolução, aumento da solubilidade e aumento do efeito farmacodinâmico em comparação com o HCTZ comercial.

MENDES (*et al.*, 2016) usaram ciclodextrinas como estratégia para melhorar a estabilidade e as propriedades biofarmacêuticas da hidroclorotiazida, produzindo complexos de inclusão. Nos estudos de fase de solubilidade, a β -ciclodextrina foi identificada como a ciclodextrina que forneceu os resultados mais promissores em termos de solubilização do fármaco. A formação do complexo de inclusão foi eficaz na melhoria das propriedades biofarmacêuticas da hidroclorotiazida e na proteção do fármaco da hidrólise.

SULTAN (*et al.*, 2017) utilizaram micelas mistas como estratégia para melhorar a dissolução e a permeabilidade da hidroclorotiazida. Os autores utilizaram colato de sódio, lectina com poloxâmero ou PEG para composição das micelas. Os estudos mostraram uma melhora no transporte do fármaco após a incorporação em sistema micelar.

SINGH (*et al.*, 2017) criaram uma formulação híbrida baseada em dendrímeros de poli(amidoamina) PAMAM como veículo para terapia combinada do medicamento anti-hipertensivo ramipril (RAPL) e o diurético hidroclorotiazida (HCTZ). Os resultados mostraram que a solubilidade de RAPL e HCTZ foi dependente da concentração de dendrímeros e do pH da solução de dendrímeros.

ALGHAMDI (2014) estudou o comportamento da HCTZ em eletrodo de carbono vítreo em tampão Britton-Robinson pH 3 usando voltametria de redissolução anódica (ASV) e voltametria cíclica (CV). Esse medicamento apresenta um pico de oxidação bem definido em 1,2 V *versus* Ag/AgCl como eletrodo de referência. O autor encontrou uma curva de calibração na faixa linear de 4×10^{-6} a 4×10^{-5} mol L⁻¹ usando ASV e um limite de detecção de $4,3 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. Foi determinado também a concentração de HCTZ em fluidos biológicos obtendo boa recuperação para urina humana e plasma. O sistema desenvolvido apresentou boa reprodutibilidade e estabilidade.

EISELE (*et al.*, 2014) determinaram simultaneamente Hidroclorotiazida (HCTZ) e Valsartana (VAL) por voltametria de onda quadrada usando eletrodo de diamante dopado com boro, encontrou uma faixa linear de concentração de 1,97 a

88,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 9,88 a 220 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, em solução tampão Britton-Robinson pH 5 com limite de detecção de 0,639 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,935 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

SILVA (*et al.*, 2015) fizeram a determinação simultânea dos medicamentos anti-hipertensivos, Besilato de Amlodipina (AML) e Hidroclorotiazida (HCTZ) em amostras de urina sintética. A determinação foi realizada em eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente usando voltametria de onda quadrada (SWV) e tampão Britton-Robinson pH 2. AML e HCTZ apresentaram picos de oxidação em 0,88 V e 1,30 V, respectivamente. A curva analítica mostrou uma resposta linear na faixa de concentração de 0,200 a 9,09 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e de 4,00 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ, com limite de detecção de 60,0 nmol L^{-1} e de 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e HCTZ, respectivamente. As recuperações desses analitos variaram de 91,0 a 107%. O método proposto é simples, rápido e de baixo custo, representando uma boa alternativa para a determinação simultânea de AML e HCTZ em amostras de urina.

BEITOLLAHI (*et al.*, 2015) sintetizaram um composto derivado de ferroceno, 2-clorobenzoil-ferroceno e o utilizou para construir um eletrodo de pasta de carbono modificado com folhas de óxido de grafeno. Com esse eletrodo desenvolvido o autor determinou HCTZ em tampão PBS pH 7 por voltametria de onda quadrada (SWV) em uma faixa linear de 5×10^{-8} a 10^{-4} mol L^{-1} e um limite de detecção de 20 nmol L^{-1} . Além disso, o eletrodo modificado foi usado na determinação simultânea de HCTZ e ácido fólico em amostras de soro de sangue humano e urina.

MACHINI (*et al.*, 2015) prepararam e caracterizaram um eletrodo modificado com hidróxido de níquel para investigar o comportamento eletroquímico da HCTZ. A curva analítica foi realizada em NaOH 0,5 mol L^{-1} por voltametria linear, a faixa de concentração foi de $1,39 \times 10^{-5}$ a $1,67 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} com limite de detecção de $7,96 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} e sensibilidade de 0,138 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$.

HELI (*et al.*, 2017) sintetizaram um nanomaterial de níquel e usaram como modificador em eletrodo de pasta de carbono para fabricar um sensor amperométrico da HCTZ. O mecanismo e a cinética da oxidação eletrocatalítica da hidroclorotiazida na superfície do eletrodo modificado foram estudados por voltametria cíclica e cronoamperometria. Um procedimento amperométrico foi desenvolvido para determinação da hidroclorotiazida com sensibilidade de

13,50 mA mol⁻¹ dm³ cm⁻² e limite de detecção de 21,2 µmol dm⁻³. O método foi utilizado para o ensaio direto de hidroclorotiazida em amostras de soro humano e em comprimidos de hidroclorotiazida.

KARIMI-MALEH (*et al.*, 2017) criou um sensor voltamétrico para determinação simultânea de captopril (CA), acetaminofeno (AC), tirosina (TY) e hidroclorotiazida (HCTZ). O dispositivo foi construído usando NiO / CNTs e (2-(3,4-di-hidroxifenetil) isoindolina-1,3-diona) (DPID) para modificar eletrodos de pasta de carbono (CPE). O autor verificou que o eletrodo NiO / CNTs / DPID / CPEs facilitou a análise de CA, AC, TY e HCTZ em tampão PBS pH 9 nas faixas de concentração de 0,07 a 200,0, 0,8 a 550,0, 5,0 a 750,0 e 10,0 a 600,0 µmol L⁻¹ com os respectivos limites de detecção de 9,0 nmol L⁻¹, 0,3 µmol L⁻¹, 1,0 µmol L⁻¹ e 5,0 µmol L⁻¹. O material desenvolvido foi utilizado para a determinação dos analitos mencionados em amostras reais farmacêuticas e biológicas (comprimidos e urina).

MORAES (*et al.*, 2017) realizaram a determinação de quatro medicamentos anti-hipertensivos, como besilato de amlodipina (AML), cloridrato de amiloreto (AMI), hidroclorotiazida (HCTZ) e atenolol (ATN) em eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente para determinação voltamétrica de onda quadrada desses fármacos com picos oxidativos muito bem resolvidos e reprodutíveis em 0,68, 0,89, 1,04 e 1,21 V (vs Ag / AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl)), respectivamente, em solução tampão de amônio (pH 9,0). A faixa de concentração obtida foi de 0,90–31, 8,7–125, 29–260 e 11–91 µmol L⁻¹ com limite de detecção de 0,30, 0,09, 0,08 e 0,06 µmol L⁻¹ para AML, AMI, HCTZ e ATN, respectivamente. Além disso, excelentes recuperações também foram obtidas na análise da amostra de água da torneira.

HUDARI (*et al.*, 2018) desenvolveram um sensor voltamétrico em eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (GCE/MWCNT) para determinação simultânea de dois diuréticos hidroclorotiazida (HCTZ) e triamtereno (TRT). As curvas analíticas foram realizadas em tampão Britton-Robinson pH 4 por voltametria de adsorção de varredura linear, apresentaram faixa linear de $1,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os limites de detecção para HCT e TRT foram de $2,8 \times 10^{-8}$ e $2,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. O método mostrou uma ampla faixa linear, baixos limites de detecção e excelente desempenho na determinação simultânea de HCT e TRT em água da torneira, água da estação de tratamento de água e

amostras de urina artificial. O limite de detecção do método eletroquímico foi menor que o do método comparativo de HPLC-DAD, e não houve diferença significativa (com um nível de confiança de 95%) entre os métodos quando aplicados para análise de uma amostra de hemodiálise.

MATTIOLI-BELMONTE (*et al.*, 2014) fizeram um revestimento à base de nanopartículas de quitosana carregada com ciprofloxacina sobre substratos de titânio para obter uma superfície de implante ortopédico capaz de liberar *in situ* o antibiótico para prevenção de infecções pós-operatórias. As nanopartículas de quitosana carregadas com ciprofloxacina foram obtidas usando a combinação de éter sulfobutil-beta-ciclodextrina e gama-ciclodextrina. Este revestimento antibacteriano foi capaz de inibir *in vitro* o crescimento de duas cepas nosocomiais de *Staphylococcus aureus*, com uma redução de cerca de 20 vezes em comparação aos controles. No geral, o revestimento investigado representa um candidato promissor para o desenvolvimento de um novo transportador de antibióticos para implantes de titânio.

HUO (*et al.*, 2016) desenvolveram um filme de amido com microcápsulas de quitosana para liberação controlada de antofloxacina. Após a incorporação das microcápsulas de quitosana na matriz do filme, as interações sinérgicas entre esses transportadores de drogas foram significativas. A termoestabilidade, as propriedades mecânicas e morfológicas da mistura foram melhoradas significativamente e contribuíram para o desenvolvimento de uma interação sinérgica.

RUSSO (*et al.*, 2016) realizaram um estudo de um sistema de entrega intra-articular constituído por um clodronato veicular em gel de poloxâmero em nanopartículas de quitosana. Este sistema foi concebido para obter uma liberação específica e controlada de clodronato nas articulações para reduzir o efeito degenerativo reumatoide da artrite. O clodronato (CLO) tem propriedades anti-inflamatórias, inibindo a secreção de citocinas e NO dos macrófagos, causando apoptose nessas células. A quitosana foi usada para desenvolver nanossistemas por gelificação ionotrópica e o glutaraldeído foi utilizado para aumentar a estabilidade das nanopartículas e modificar o perfil de liberação.

LUCERO (*et al.*, 2016) desenvolveram uma quitosana tiolada capaz de modular a liberação dos medicamentos teofilina e diltiazem, em dispersões aquosas

preparadas com 1% ou 3% em massa/volume de quitosana e 0,5% do fármaco. Os estudos mostraram que a concentração da quitosana e a natureza química dos medicamentos são fatores importantes na liberação do fármaco.

KARIMINIA (*et al.*, 2016) criaram um sistema transportador de fármaco responsivo ao pH usando nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana (CS-Fe₃O₄) para liberação prolongada do antibiótico ciprofloxacina, carregado por meio de interações de ligação hidrogênio. A carga *in vitro* do medicamento a pH 4,8 e a cinética de liberação a pH 7,4 revelaram que o sistema de administração do medicamento pode receber 99% da carga de ciprofloxacina e liberar quantitativamente o medicamento por um período prolongado de 5 dias. Além disso, foi confirmada a capacidade do ultrassom de baixa frequência na liberação rápida do fármaco encapsulado em menos de 60 minutos das nanopartículas de CS-Fe₃O₄ de maneira controlada.

ARANAZ (*et al.*, 2016) produziram filmes de quitosana carregados com cloridrato de ciprofloxacina (CFX) e nanopartículas de prata (AgNPs) controlando a liberação através do grau de reticulação com tripolifosfato de sódio e da espessura do filme. O efeito antimicrobiano dos filmes de quitosana carregados com CFX e AgNPs contra *Pseudomonas aeruginosa* foi testado e os filmes carregados com antimicrobiano exibiram uma zona de inibição semelhante à dos controles com CFX e superior à dos filmes de quitosana.

SOARES (*et al.*, 2016) desenvolveram dois sistemas de administração de medicamentos encapsulando doxorrubicina (quimioterápico) em nanopartículas de quitosana e O-HTCC (derivado de amônio quaternário da quitosana). Os resultados mostram que a liberação de doxorrubicina é independente da massa molar média e é maior no pH ácido (4,5) do que no pH fisiológico. As nanopartículas de O-HTCC levaram a uma maior quantidade de doxorrubicina liberada do que as nanopartículas de quitosana, nas mesmas condições experimentais, embora o mecanismo de liberação não tenha sido alterado.

LIU e HE (2015) conseguiram encapsular um fármaco hidrofílico (aspirina) e um fármaco hidrofóbico (probuco), usados no tratamento de reestenose, a uma quitosana quaternária de sal de amônio modificada usando tripolifosfato como reticulador. Os autores demonstraram que as nanopartículas carregadas com os dois

medicamentos exibiram taxas de liberação mais altas e maiores quantidades de liberação dos dois medicamentos do que nos casos em que foram carregados apenas com aspirina ou probucol.

Com isso, podemos verificar a utilização do fármaco hidroclorotiazida é muito interessante em sistemas de liberação controlada, sendo que a determinação da quantidade liberada por métodos eletroquímicos pode contribuir significativamente com o desenvolvimento de novas formas de análise destes sistemas.

2 OBJETIVO

Este projeto tem por objetivo desenvolver um sistema de liberação controlada de fármacos utilizando quitosana e analisando a liberação por espectroscopia de absorção no UV-vis e técnicas eletroquímicas. Este objetivo geral pode ser dividido nos seguintes objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar a quitosana comercial (CS_{com}), a quitosana de alta massa molar (CS_{mod}) e a quitosana quaternizada (CS_{quat});
- ✓ Determinar qual quitosana (CS_{com} , CS_{mod} ou CS_{quat}) apresenta melhor resultado no sistema de liberação controlada do fármaco hidroclorotiazida (HCTZ);
- ✓ Otimizar o sistema de liberação controlada do fármaco HCTZ;
- ✓ Caracterizar a superfície do eletrodo de carbono vítreo modificada com nanotubos de carbono de parede múltiplas e nanopartículas de ouro (GC/MWCNTsf/Au);
- ✓ Caracterizar a hidroclorotiazida por técnicas eletroquímicas e técnicas espectroscópicas;
- ✓ Determinar as curvas analíticas e os perfis de liberação da HCTZ nos pHs 2 e 7 a 37 °C (simulando assim os pHs encontrados no estômago e no intestino) por espectroscopia de absorção no UV-vis e por voltametria de pulso diferencial (DPV).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A Tabela 2 mostra a relação de reagentes utilizados neste projeto.

Tabela 2- Relação de reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Teor (%)	Procedência
Ácido Acético	CH ₃ CO ₂ H	60,04	99,7	Qhemis
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61,83	99	Synth
Ácido Clorídrico	HCl	36,46	37	Quimis
Ácido Fosfórico	H ₃ PO ₄	98,0	85	Qhemis
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	98,08	95 a 98	Qhemis
Ácido Nítrico	HNO ₃	63,01	64 a 66	Synth
Ácido Tetracloroáurico (III)	HAuCl ₄ .3H ₂ O	393,83	≥ 99,9	Aldrich
Álcool Etílico	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	99,8	Neon
Borohidreto de Sódio	NaBH ₄	37,83	99,9	Aldrich
Brometo de Potássio	KBr	119,00	≥ 99	Sigma
Cloreto de Potássio	KCl	74,55	99	Sigma
Ferricianeto de potássio	K ₃ Fe(CN) ₆	329,26	99,4	J. T. Baker
Ferrocianeto de potássio tri-hidratado	K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O	422,39	100,5	Mallinckrodt
Hidroclorotiazida	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	297,74	99	Farmácia de Manipulação Rosário de São Carlos (SP)
Hidróxido de Sódio	NaOH	39,9971	≥ 98	Sigma-Aldrich
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	34,01	29	Synth
N,N-Dimetilformamida	(CH ₃) ₂ NC(O)H	73,09	99,8	Sigma-Aldrich
Tripolifosfato de Sódio	Na ₅ P ₃ O ₁₀	367,86	85	Synth

Fonte: Autoria própria.

Além disso, foram utilizados nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs, diâmetro: 110-170 nm, comprimento: 5-9 µm, >90%, Aldrich) e três tipos de quitosana: quitosana comercial purificada (CS_{com}) (Aldrich), quitosana com alta massa molar (CS_{mod}) e quitosana quaternizada (CS_{quat}) fornecidas pelo laboratório do Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana-Filho do IQSC/USP.

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Obtenção das nanopartículas de ouro

A síntese das nanopartículas de ouro foi adaptada do método proposto por MARTIN (*et al.*, 2010), em que 100, 200 ou 300 μL de solução $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 50 mmol L^{-1} contendo 50 mmol L^{-1} de HCl foi adicionado a 10 mL de água e agitado em vortex por 10 a 15 s, em seguida foi acrescentado 300 ou 400 μL de solução NaBH_4 50 mmol L^{-1} contendo NaOH 50 mmol L^{-1} , agitando a solução no vortex por 1 min, as nanopartículas obtidas foram analisadas por espectroscopia de absorção no UV-vis (Marca: Avantes, Fonte de luz: AVA Light DHS, *Software*: AvaSoft) e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)(Marca: JEOL - Modelo: JEM2100 LaB₆ 200 kV).

3.3.2 Incorporação das nanopartículas de ouro aos nanotubos de carbono

Para que ancoragem do ouro ocorresse os nanotubos foram funcionalizados utilizando o seguinte método: uma amostra de 20 mg de MWCNTs foi colocada em refluxo por 24 h com ácido nítrico 3 mol L^{-1} em temperatura ambiente. O material resultante foi filtrado e lavado com água purificada até obter pH neutro. Depois, o material foi suspenso em solução de ácido clorídrico 5 mol L^{-1} por 6 h em refluxo na temperatura ambiente. Novamente o material resultante foi filtrado e lavado até obter pH neutro e levado à mufla em uma temperatura de 510 °C por 1 h. O produto final é o nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado (MWCNTsf) (MALUTA *et al.*, 2014).

A incorporação das nanopartículas de ouro foi realizada a partir da adaptação do método de MARTIN (*et al.*, 2010), em que 5 mg de MWCNTs funcionalizados foram dispersos em solução contendo 5 mL de H_2O e 5 mL de dimetilformamida (DMF) e dispersos em ultrassom (Thornton-modelo CHUBBY) por 30 min. Após este tempo, foram adicionados 300 μL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 50 mmol L^{-1} contendo

50 mmol L⁻¹ de HCl, agitado no vórtex por 10 a 15 s. A seguir foi adicionado 300 µL de NaBH₄ 50 mmol L⁻¹ contendo de NaOH 50 mmol L⁻¹, com a solução sendo agitada no vortex por 1 min. A solução foi deixada em temperatura ambiente por 24h em seguida foi centrifugada a 10 000 rpm por 10 min em 10°C (Marca: Eppendorf, modelo: 5427 R), lavada para remover resíduos de síntese e seca em estufa (Qualxtron) 12 h a 110 °C obtendo assim o material MWCNTsf/Au.

3.3.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo

Para as medidas eletroquímicas foram utilizados como eletrodo de trabalho um disco de carbono vítreo (GC) 0,07 cm², como eletrodo de referência o sistema Ag/AgCl/KCl 3M e como contra eletrodo uma placa de platina com 0,80 cm².

Foram realizados dois procedimentos de limpeza do eletrodo de carbono vítreo. No primeiro procedimento, o eletrodo foi polido com alumina 0,3 µm, lavado com água pura e etanol, em seguida foi realizada a limpeza eletroquímica em meio de NaOH 0,05 mol L⁻¹ aplicando a voltametria cíclica no intervalo de 0,0 a 1,0 V, sendo executados 50 ciclos a 0,1 V s⁻¹. No segundo procedimento, o eletrodo de carbono vítreo foi polido com alumina, lavado com água pura e etanol, em seguida foi feita a limpeza eletroquímica em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, primeiro o eletrodo foi polarizado -2 V por 30s, em seguida realizou-se a voltametria cíclica em 4 etapas: 100 ciclos a 1 V s⁻¹, 50 ciclos a 0,5 V s⁻¹, 25 ciclos a 0,25 V s⁻¹ e 10 ciclos a 0,10 V s⁻¹ numa janela de potenciais de 0,0 a 1,0 V.

3.3.4 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro

Após a limpeza, 12 µL da solução contendo nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs ou MWCNTsf/Au) dispersos em dimetilformamida (DMF) na concentração de 1 mg mL⁻¹, foi gotejada na superfície do eletrodo de trabalho deixando secar em temperatura ambiente durante 24 h, dentro de um dessecador contendo sílica-gel.

3.3.5 Caracterização morfológica

O material contendo nanotubos de carbono de parede múltipla e nanopartículas de ouro (MWCNTsf/Au) foi caracterizado por difração de raios-X (Marca: Bruker, Modelo: D8 Advance), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Marca: JEOL, Modelo: JEM2100 LaB₆ 200 kV), microscopia óptica (Microscópio Digital, Marca: Hirox, Modelo: KH-7700), microscopia de força atômica (AFM) (Microscópio Easyscan 2, Nanosurf, Suíça, no modo de operação não contato com ponteira Tap 190Al-G, Budget Sensors, Bulgária de frequência ressonante de 190 Hz e constante de força igual a 48 N m⁻¹). O tratamento das imagens obtidas por AFM foi realizado no software Gwyddion.

3.3.6 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado

Para a caracterização eletroquímica do eletrodo modificado GC/MWCNTsf/Au foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (VC) de 0,4 a 1,2 V, 100 mV s⁻¹ e voltametria de pulso diferencial (DPV) de 0,4 a 1,2 V, passo de 4 mV, amplitude 60 mV, tempo de modulação 0,05 s e tempo de intervalo 0,1 s em tampão Britton-Robinson nos pHs 2 e 7. Além disso, foi realizada também a impedância eletroquímica em meio de K₄Fe(CN)₆·3H₂O 50 mmol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 50 mmol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹ do eletrodo de carbono vítreo limpo em meio de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, bem como do eletrodo modificado com GC/MWCNTs e GC/MWCNTsf/Au. Para verificar a presença de ouro foi realizada a voltametria cíclica em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹.

3.3.7 Comportamento eletroquímico da hidroclorotiazida

Os estudos do comportamento eletroquímico da HCTZ foram realizados em meio de tampão Britton-Robinson nos pHs 2 e 7 preparados conforme a Tabela 3.

Tabela 3- Concentrações usadas na preparação dos tampões Britton-Robinson.

pH	NaOH	CH ₃ CO ₂ H	H ₃ PO ₄	H ₃ BO ₃	KCl 0,1M
2	0,381 g L ⁻¹	2,288 g L ⁻¹	3,733 g L ⁻¹	2,355 g L ⁻¹	6,113 g L ⁻¹
7	2,754 g L ⁻¹	1,575 g L ⁻¹	2,570 g L ⁻¹	1,622 g L ⁻¹	1,804 g L ⁻¹

Fonte: MONGAY *et al.*, 1974.

As pesagens foram realizadas em balança analítica Mettler Toledo da Micronal S/A – modelo AL 204 e o pH foi conferido no pH-metro Qualxton modelo 8010.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato / galvanostato PGSTAT30/Autolab® utilizando o *software* Nova 2.1.2.

Todas as soluções foram preparadas em água purificada com resistividade de 18 MΩ cm⁻¹, sistema de purificação Barnstead™ Nanopure™ (ThermoScientific).

3.3.8 Determinação da hidroclorotiazida por UV-vis

Foram realizados estudos do comportamento da HCTZ por espectroscopia de absorção no UV-vis (Marca: Avantes, Fonte de luz: AVA Light DHS, *Software*: AvaSoft) em que foi usada uma cubeta de quartzo com volume de 1000 μL e 10⁻¹ cm de caminho óptico, que foi limpa em solução piranha (3 partes de H₂SO₄ para 1 parte de H₂O₂) antes e após as medidas.

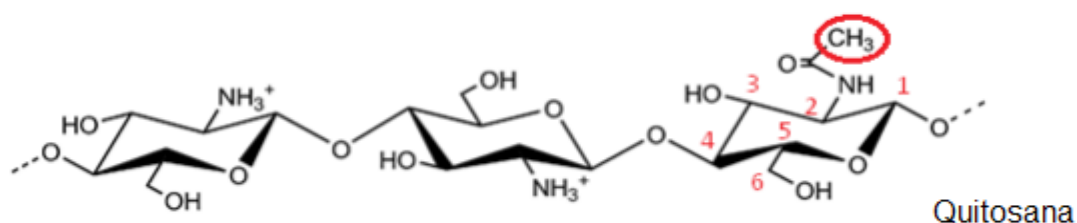
3.3.9 Caracterização da Quitosana

A quitosana comercial foi purificada seguindo o método descrito na literatura (SANTOS *et al.*, 2016), foi dissolvida em solução de ácido acético 1% por aproximadamente 18 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva através de membrana de porosidade 0,45 μm. Adicionou-se hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ até a precipitação. O precipitado foi lavado com água várias vezes até pH neutro e por fim foi congelado e liofilizado. Foi realizada a difração de Raio-X para verificar a purificação da amostra.

Para determinar o grau de acetilação da quitosana foi utilizada a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN),

seguindo o procedimento definido por HIRAI (*et al.*, 1991), com a relação entre as intensidades de dois sinais: (a) hidrogênios da metila do grupo acetamido (≈ 2 ppm) e (b) H2-H6 das unidades GlcN/GlcNAc (4,1 – 3,0 ppm), Figura 10.

Figura 10 - Estrutura da quitosana apontando o grupo metila da unidade acetilada (círculo vermelho) e correspondente a numeração dos carbonos.



Fonte: Adaptado de NYGAARD *et al.*, 2015.

Os espectros foram obtidos a 80 °C em um espectrômetro Bruker Advance III (400 MHz), 10 mg das amostras foram dispersadas em 1 mL de solução 1% HCl/D₂O (v/v) e deixadas sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12 h (a noite toda).

Com isso, o grau de acetilação foi determinado pela equação (HIRAI *et al.*, 1991):

$$GA (\%) = \left| \frac{\frac{1}{3} I_{CH_3}}{\frac{1}{6} I_{H_2-H_6}} \right| \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Para determinar as massas molares médias foi realizada a determinação da viscosidade intrínseca das amostras (η). Para isso, as quitosanas foram solubilizadas em solução de ácido acético/acetado de sódio (0,3 e 0,2 mol L⁻¹, respectivamente) e filtradas em membranas de celulose (Millipore) de 0,80 mm. As concentrações dos polímeros foram suficientemente baixas para resultar em viscosidades relativas entre 1,2 e 1,8. As amostras (15 mL) foram então acondicionadas em um recipiente contendo um capilar de 0,53 mm de diâmetro, imerso em um banho de água a 25 °C. As medidas foram realizadas em um viscosímetro AVS-360 acoplado a uma bureta automática AVS-20, ambos da

empresa Schott-Geräte. Diluições programadas foram efetuadas para obtenção de pontos suficientes para composição de um gráfico de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) versus concentração (C). A viscosidade intrínseca foi então determinada através da extrapolação desta curva para concentração zero (diluição infinita). Estes ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.10 Encapsulamento da hidroclorotiazida

O encapsulamento da hidroclorotiazida foi realizado por meio da técnica conhecida como gelificação iônica com a utilização do poliânion tripolifosfato de sódio (TPP), quitosana comercial purificada (CS_{com}), quitosana com alta massa molar (CS_{mod}) e quitosana quaternizada (CS_{quat}).

4,5 mg de hidroclorotiazida foram misturadas a 10 mL de solução de quitosana (CS_{com} ou CS_{mod}) 2 mg mL⁻¹ em ácido acético 1% na temperatura de 50 °C para garantir a solubilização do fármaco. Para a quitosana quaternizada (CS_{quat}) dissolvemos 2 mg mL⁻¹ em água pura. Na sequência utilizando-se um titulador automático da Metrohm (Figura 11) na vazão de 1,0 ou 0,5 ml min⁻¹ para gotejar a solução de tripolifosfato de Sódio 4,52 mg mL⁻¹, em seguida foi mantida agitação constante por 2h. Foram também realizadas a formação das partículas sem a presença do fármaco para comparação.

O titulador automático foi utilizado para controlar a vazão de gotejamento do TPP sobre a solução contendo quitosana e medicamento.

Outros testes de otimização do sistema foram realizados nas proporções mostradas na Tabela 4, em que foi adicionado 4,5 mg de HCTZ em todas as amostras e o TPP foi gotejado na vazão de 0,5 ml min⁻¹.

A solução obtida foi então centrifugada 10 000 rpm, 5 min a 10°C (Marca: Eppendorf, modelo: 5427 R) e lavada com H₂O pura, o sobrenadante foi retirado e foi deixado no dessecador por pelo menos 48 h antes de realizar os testes de liberação.

Figura 11 - Titulador automático.



Fonte: Autoria própria.

As amostras da Tabela 4 também foram submetidas após a centrifugação ao processo de liofilização. Nesse caso as amostras foram congeladas e depois colocadas no liofilizador. Assim, podemos verificar qual processo de secagem é melhor, o uso do dessecador ou a liofilização.

Tabela 4- Preparação das amostras de encapsulamento de hidroclorotiazida (HCTZ) usando quitosana (CS) e tripolifosfato de sódio (TPP).

Quitosana (2 mg mL ⁻¹)	Proporção CS/TPP (v/v)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
CS _{com}				
CS _{mod}	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
CS _{quat}				
TPP (1 mg mL ⁻¹)	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL

Fonte: Autoria própria.

Para verificar o encapsulamento utilizamos a técnica de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)(Marca: Shimadzu, Modelo:

IRAffinity 1), preparamos pastilhas de KBr (Sigma) maceradas em almofariz com 100 mg de Kbr.

A quantidade encapsulada é calculada segundo a equação:

$$\%Encapsulada = \frac{[HCTZ]_{inicial} - [HCTZ]_{centrifugada}}{[HCTZ]_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A equação 2 foi utilizada para calcular a eficiência de encapsulamento da hidroclorotiazida pelo método de gelificação iônica adotado neste trabalho (KAMARAJ *et al.*, 2018; KARIMINIA *et al.*, 2016).

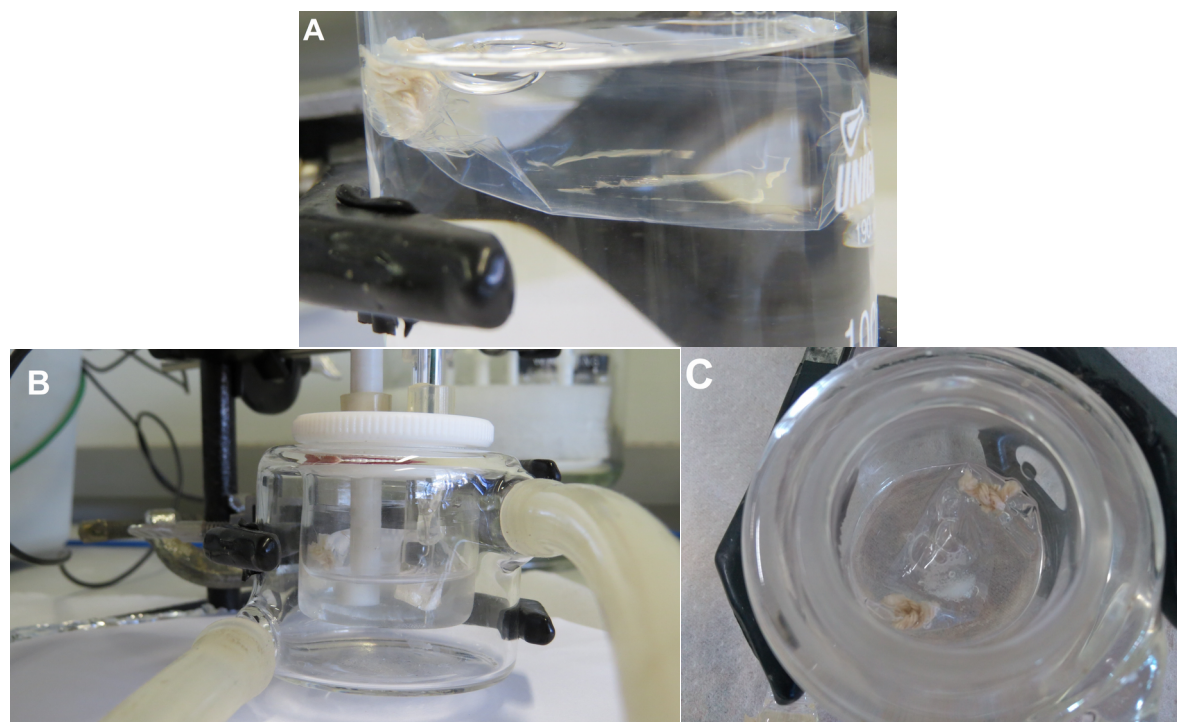
3.3.11 Testes de liberação

Inicialmente optou-se por utilizar a Espectroscopia de Absorção no UV-vis para realizar os testes de liberação do fármaco, porque além de ser uma das técnicas mais usada nas pesquisas com liberação controlada, os testes eletroquímicos envolvem etapas de preparação do eletrodo e otimização dos parâmetros que devem ser realizados antes do levantamento das curvas analíticas e dos testes de liberação.

Os testes de liberação foram feitos em tampão Britton-Robinson nos pHs 2 e 7 em banho térmico a 37 °C, uma alíquota de 800 µL era acrescentada na cubeta, a medida de UV-vis era realizada e o conteúdo era devolvido ao frasco de liberação no banho térmico.

As amostras foram colocadas dentro de sacos de diálise (Sigma-Aldrich, largura 25 mm, tamanho de poro 12 000 Da MWCO) conforme podemos observar na Figura 12A. Nas medidas eletroquímicas foi utilizada uma cela termostatizada a 37 °C conforme podemos observar na Figura 12B, em que dentro do saco de diálise foram adicionados 3 mL e na parte externa 7 mL de tampão. Os eletrodos foram acomodados ao redor do sistema sem que tocassem no saco de diálise. A Figura 12C mostra em detalhe o analito (CS/TPP/HCTZ) dentro do saco de diálise, destacado em branco dentro do saquinho.

Figura 12 - Imagem do sistema utilizado na liberação controlada (A) Saco de diálise mergulhado em solução tampão; (B) Sistema usado na liberação por controle eletroquímico com cela termostatizada a 37°C; (C) Detalhe do saco de diálise contendo o analito.



Fonte: Autoria própria.

Os gráficos de liberação cumulativa em relação ao tempo de liberação foram construídos a partir da seguinte equação:

$$\% \text{liberação cumulativa} = \frac{[\text{HCTZ}]_{\text{liberada}}}{[\text{HCTZ}]_{\text{total}}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que a quantidade de $[\text{HCTZ}]_{\text{liberada}}$ corresponde ao valor obtido a cada medida de 30 min e a $[\text{HCTZ}]_{\text{total}}$ corresponde a quantidade que foi efetivamente incorporada na amostra (KARIMINIA *et al.*, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

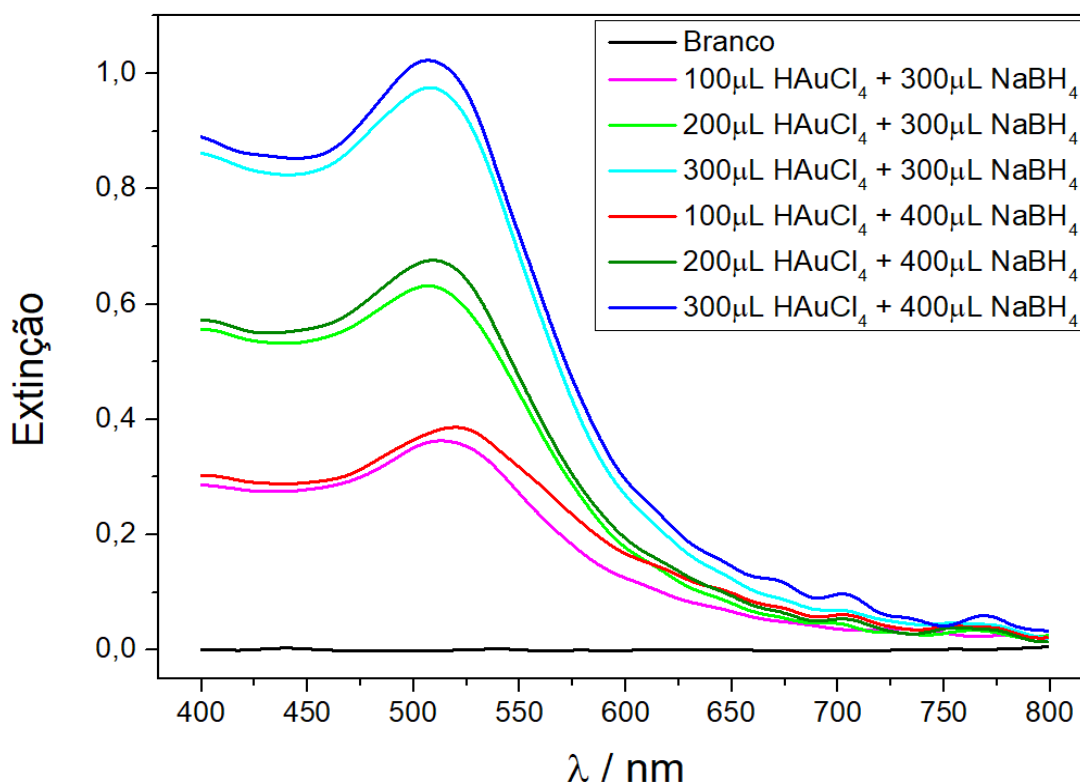
4.1 Caracterização do nanomaterial

4.1.1 Caracterização morfológica das nanopartículas de ouro e dos nanotubos de carbono

Primeiro foi realizado o estudo a partir da síntese proposta por MARTIN (*et al.* 2010) para determinar qual a melhor quantidade de solução de $\text{HAuCl}_4/\text{HCl}$ e $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ para a preparação das nanopartículas de ouro a serem utilizadas na modificação dos nanotubos de carbono.

A Figura 13 mostra os dados de espectroscopia na região do UV-vis das nanopartículas de ouro preparadas com diferentes quantidades de $\text{HAuCl}_4/\text{HCl}$ e $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$.

Figura 13 - Espectro na região do UV-vis das nanopartículas de ouro em água.



Fonte: Autoria Própria.

MARTIN (*et al.* 2010) descobriu que a razão dos íons $\text{BH}_4^- / \text{OH}^-$ e $\text{AuCl}_4^- / \text{H}^+$ pode ser ajustada cuidadosamente para produzir nanopartículas de ouro quase monodispersas na água. Os espectros UV-vis de nanopartículas de ouro na água cuja extinção significativa é em torno de 700 nm, indicam a existência aglomerados de nanopartículas de ouro, portanto, a distribuição de tamanho é polidispersa. A extinção abaixo de ~450 nm e acima de ~600 nm indica presença de nanopartículas de ouro monodispersas. Se a extinção a ~400 nm for linearmente proporcional à concentração de átomos de ouro, ela poderá ser usada para normalizar os espectros de UV-vis para soluções com diferentes concentrações de átomos de ouro.

As nanopartículas de ouro na água, sem produtos químicos estabilizadores, são estabilizadas por ânions à base de boro fisisorvido, cuja energia de repulsão eletrostática diminui à medida que a concentração dos íons de triagem aumenta. Isso explica parcialmente por que o tamanho das nanopartículas e a banda de absorção plasmônica em torno de ± 510 nm se tornam maiores com mais íons $\text{BH}_4^- / \text{OH}^-$. Esta banda é resultado da ressonância dos elétrons de superfície em resposta a uma exposição a radiação eletromagnética de comprimento de onda específico.

A Figura 13 mostra que os dados observados por MARTIN (*et al.* 2010) condizem com os resultados que obtivemos experimentalmente, a Tabela 5 mostra o valor do comprimento de onda da banda de absorção plasmônica das nanopartículas de ouro.

Tabela 5- Composição das nanopartículas de ouro e o comprimento de onda da banda plasmônica.

Volume de $\text{HAuCl}_4/\text{HCl}$ (μL)	Volume de $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ (μL)	λ (nm)
100	300	513
200	300	507
300	300	508
100	400	519
200	400	509
300	400	507

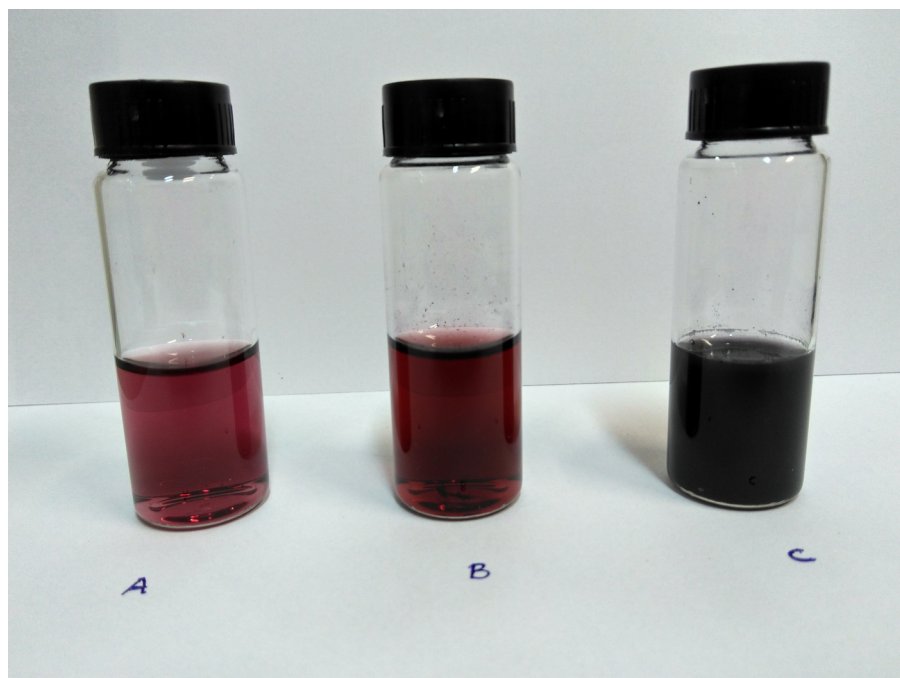
Fonte: Autoria Própria.

Para determinar qual o melhor solução a ser utilizada na modificação dos nanotubos de carbono é importante analisar não só o comprimento de onda da

banda de absorção plasmônica, mas também a largura dos picos, vemos na Figura 13 que baixas quantidades de AuCl_4^- levam a menores intensidades da banda plasmônica e também maior alargamento dos picos, este alargamento está relacionado ao tamanho das partículas e quanto mais largo mostra que há nanopartículas com tamanhos maiores, seguindo esse raciocínio decidimos utilizar em nosso trabalho as partículas preparadas com 300 μL de $\text{AuCl}_4^- / \text{H}^+$ e 300 μL de $\text{BH}_4^- / \text{OH}^-$.

Para que as nanopartículas de ouro sejam ancoradas aos nanotubos, é necessário a funcionalização do MWCNTs, que promove a formação de grupos hidroxila (-OH), carboxila (-COOH) e éster (-COO-) na superfície dos nanotubos, que se tornam pontos preferenciais para a ancoragem de nanopartículas de ouro, devido às interações eletrostáticas entre os grupos funcionais e as nanopartículas de ouro (MALUTA *et al.*, 2014).

Figura 14 - Solução contendo as nanopartículas de ouro: (A) Método de Martin (100 μL de $\text{AuCl}_4^- / \text{H}^+$ e 300 μL de $\text{BH}_4^- / \text{OH}^-$); (B) Adaptado (300 μL de $\text{AuCl}_4^- / \text{H}^+$ e 300 μL de $\text{BH}_4^- / \text{OH}^-$) e (C) Adaptado MWCNTsf/Au (300 μL de $\text{AuCl}_4^- / \text{H}^+$; 300 μL de $\text{BH}_4^- / \text{OH}^-$ e 5 mg MWCNTsf).

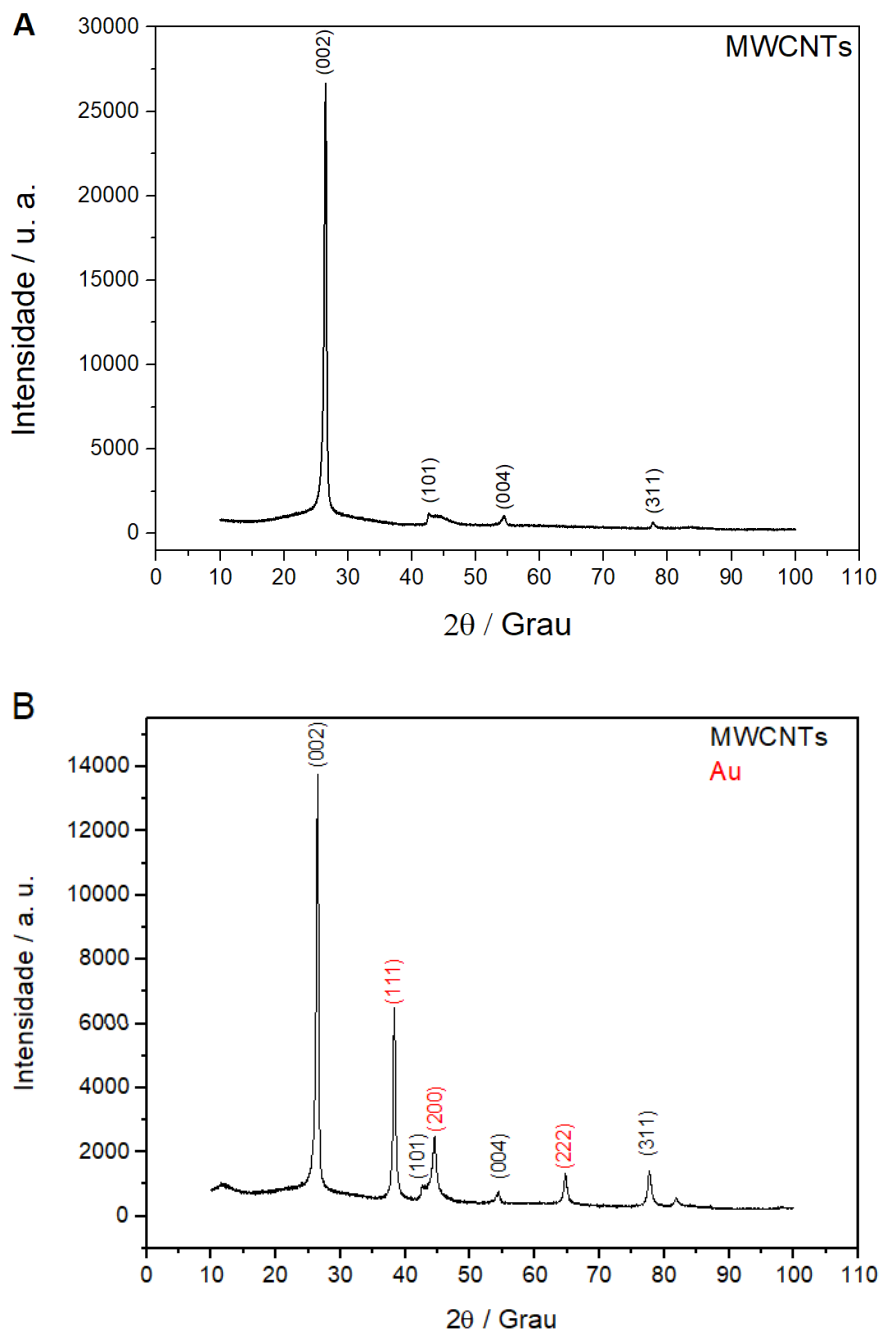


Fonte: Autoria própria.

A Figura 14 mostra a cor da solução contendo nanopartículas de ouro, observa-se que o método de Martin (Figura 14A) possui uma cor vermelha mais clara do que o método que adaptamos (Figura 14B) para o nosso trabalho que

contém uma quantidade maior de $\text{AuCl}_4^- / \text{H}^+$. Ao adicionarmos os nanotubos de carbono (Figura 14C) na solução percebemos que a cor muda para preto, justamente porque os nanotubos apresentam essa cor e não conseguimos visualizar o vermelho na solução, ao centrifugar verificamos que a solução está vermelha com a mesma intensidade da solução da Figura 14B.

Figura 15 - Difratograma de Raio-X (A) MWCNTs e (B) MWCNTsf/Au.

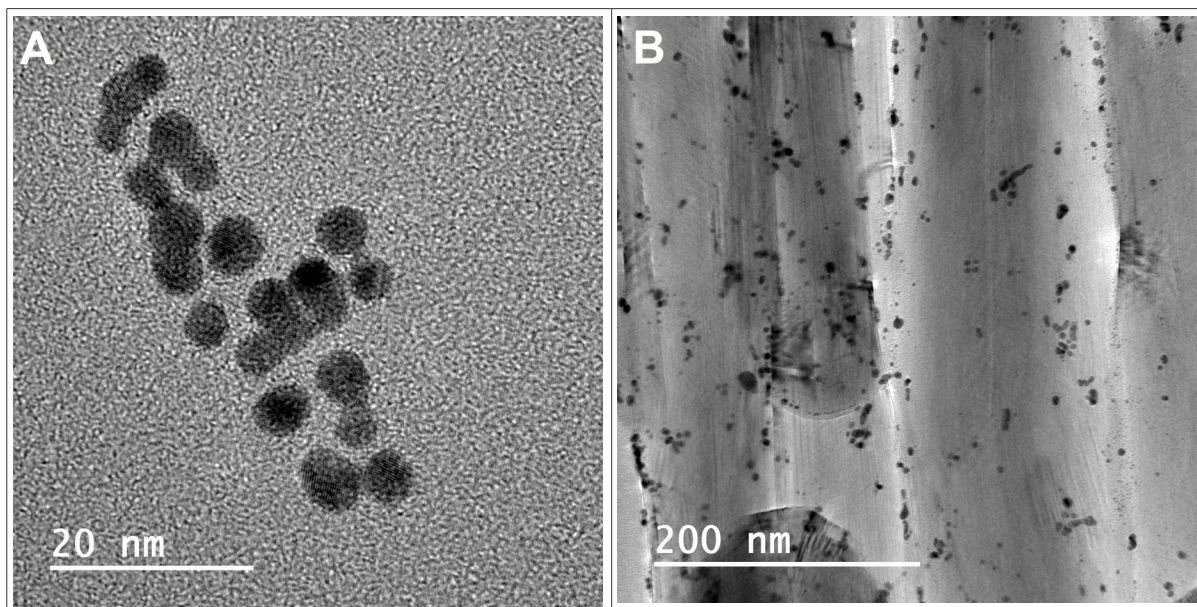


Fonte: Autoria própria.

No difratograma de Raio-X dos MWCNTs (Figura 15A) os picos $2\theta = 26,5^\circ$, $42,6^\circ$ e $54,5^\circ$ são consistentes com as faces (002), (101), (004) do MWCNTs e para o MWCNTsf/Au (Figura 15B) os picos $2\theta = 38,3^\circ$, $44,5^\circ$, $64,7^\circ$ e $81,8^\circ$ correspondem as faces (111), (200), (220) e (222) do ouro. A presença de picos intensos do Au indica a formação de partículas grandes ou agregados de nanopartículas de ouro.

A microscopia eletrônica de transmissão (Figura 16A), mostra as nanopartículas de ouro obtidas pelo método Martin adaptado com formatos bem homogêneos e com diâmetro na ordem de 5 nm. Além disso, a Figura 16B mostra que ocorreu recobrimento dos nanotubos de carbono pelas nanopartículas de ouro. Isto pode ser explicado graças à funcionalização dos nanotubos que promove a formação de grupos hidroxila (-OH), carboxila (-COOH) e éster (-COO-) na superfície dos nanotubos, que são pontos preferenciais para a ancoragem de nanopartículas de ouro.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão para: (A) nanopartículas de ouro (Au) e (B) nanotubos de carbono de parede múltiplas recobertos com nanopartículas de ouro (MWCNTsf/Au).

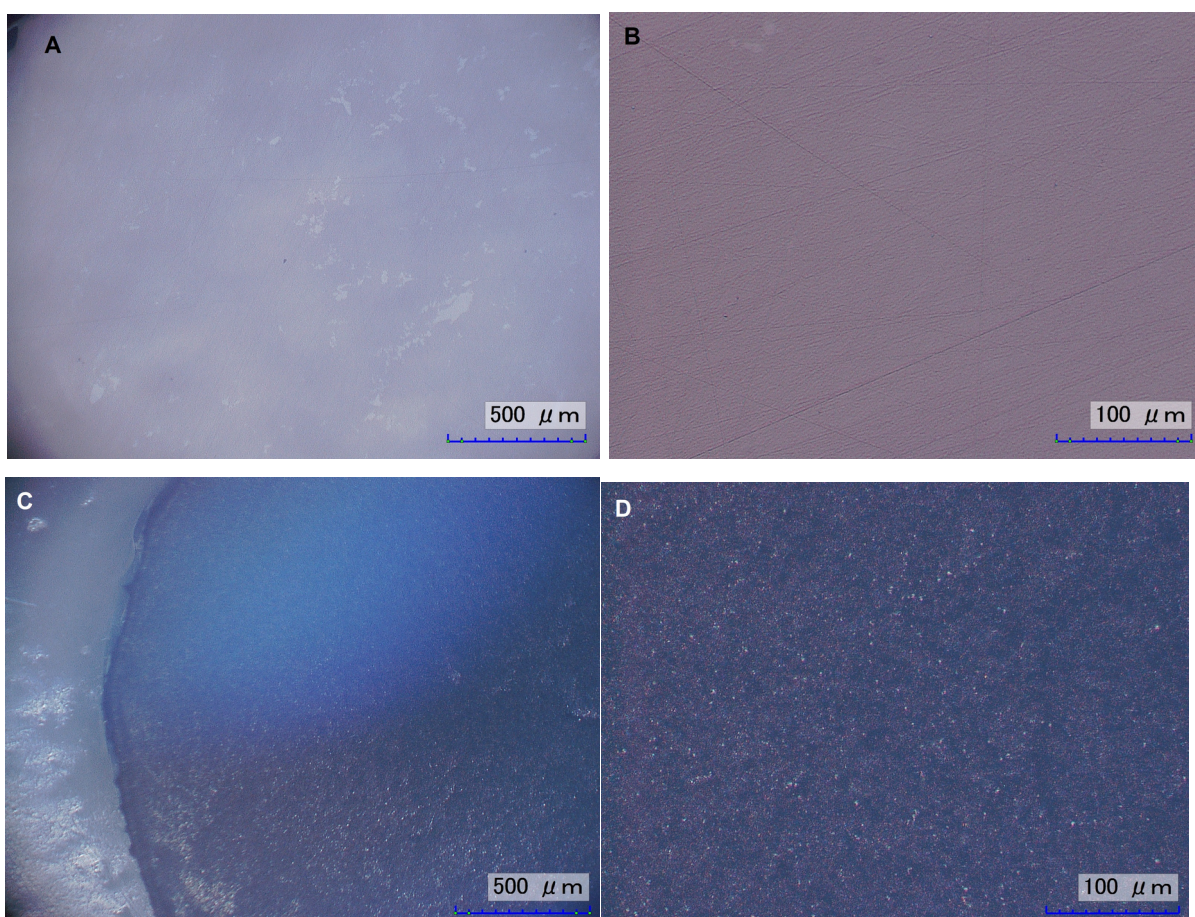


Fonte: Autoria própria.

Informações adicionais podem ser obtidas através da microscopia óptica que nos dá uma noção de como o filme está distribuído na superfície do eletrodo de carbono vítreo. A Figura 17 mostra que o eletrodo de carbono vítreo teve um bom

recobrimento da superfície com MWCNTsf/Au, a Figura 17A mostra que o GC apresenta uma superfície bem plana com alguns riscos devido a limpeza abrasiva com alumina, os pontos brancos que podem ser observados provavelmente é alumina que não foi totalmente eliminada da superfície, mesmo após a limpeza eletroquímica. Na Figura 17C vemos que o eletrodo GC/MWCNTsf/Au teve sua superfície bem recoberta pela modificação.

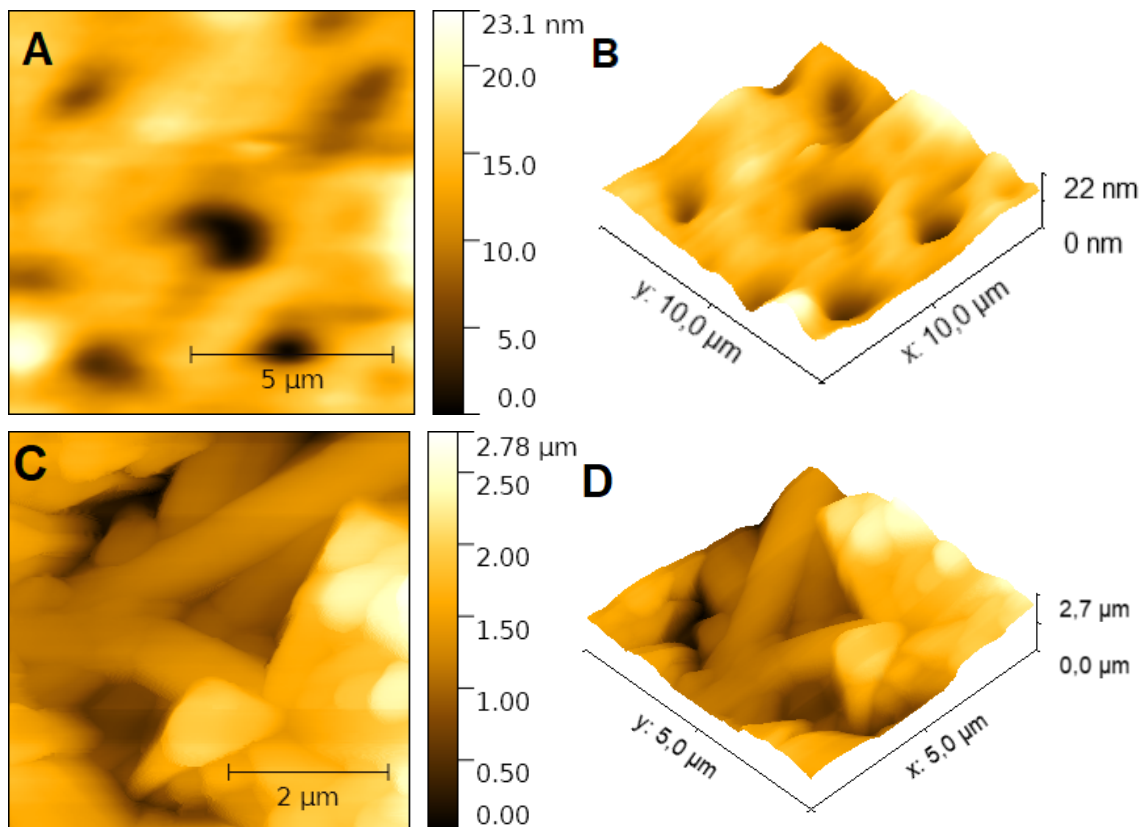
Figura 17 - Imagens de microscopia óptica do eletrodo de carbono vítreo (A,B) e do eletrodo modificado GC/MWCNTsf/Au (C,D).



Fonte: Autoria própria.

Em uma ampliação maior podemos verificar que o eletrodo modificado (Figura 17D) tem um material com características nanométricas que não pode ser observado com detalhes no microscópio óptico. Assim, utilizamos a microscopia de força atômica (AFM) que fornece informações tridimensionais da superfície em escala nanométrica para verificar a morfologia do filme de recobrimento do eletrodo.

Figura 18 - AFM do eletrodo de carbono vítreo: (A) e (B) GC sem modificação; (C) e (D) GC/MWCNTsf/Au.



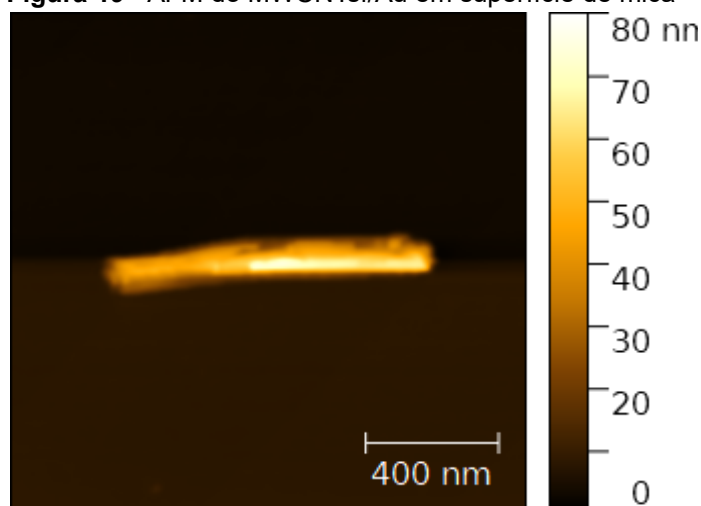
Fonte: Autoria própria.

A Figura 18 mostra as imagens obtidas por AFM do eletrodo de carbono vítreo sem modificação e com modificação (GC/MWCNTsf/Au). O GC sem modificação apresenta uma topografia com relevo plano e altura máxima de 22 nm, ao adicionarmos o depósito de nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro percebemos que a topografia muda bastante, mostrando que provavelmente a área eletroativa do material é bem maior do que a área geométrica o que pode acarretar melhores resultados na detecção analítica de componentes, conforme será mostrado na secção 4.2.2.

O diâmetro médio do nanotubo mostrado na Figura 19 é 140 nm e o comprimento é 1 μm, o diâmetro é semelhante ao que é descrito no rótulo do fabricante conforme foi mencionado no item 3.1, que pode variar de 110 a 170 nm, porém o comprimento deu menor, o fabricante coloca como de 5 a 9 μm. O comprimento menor no nanotubo pode ser devido ao fato de termos realizado a

funcionalização do mesmo, como é um tratamento agressivo pode ser que os nanotubos tenham partido e por isso encontramos valores menores. Essas imagens do nanotubo foram realizadas em triplicata em 3 regiões diferentes.

Figura 19 - AFM do MWCNTsf/Au em superfície de mica



Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado

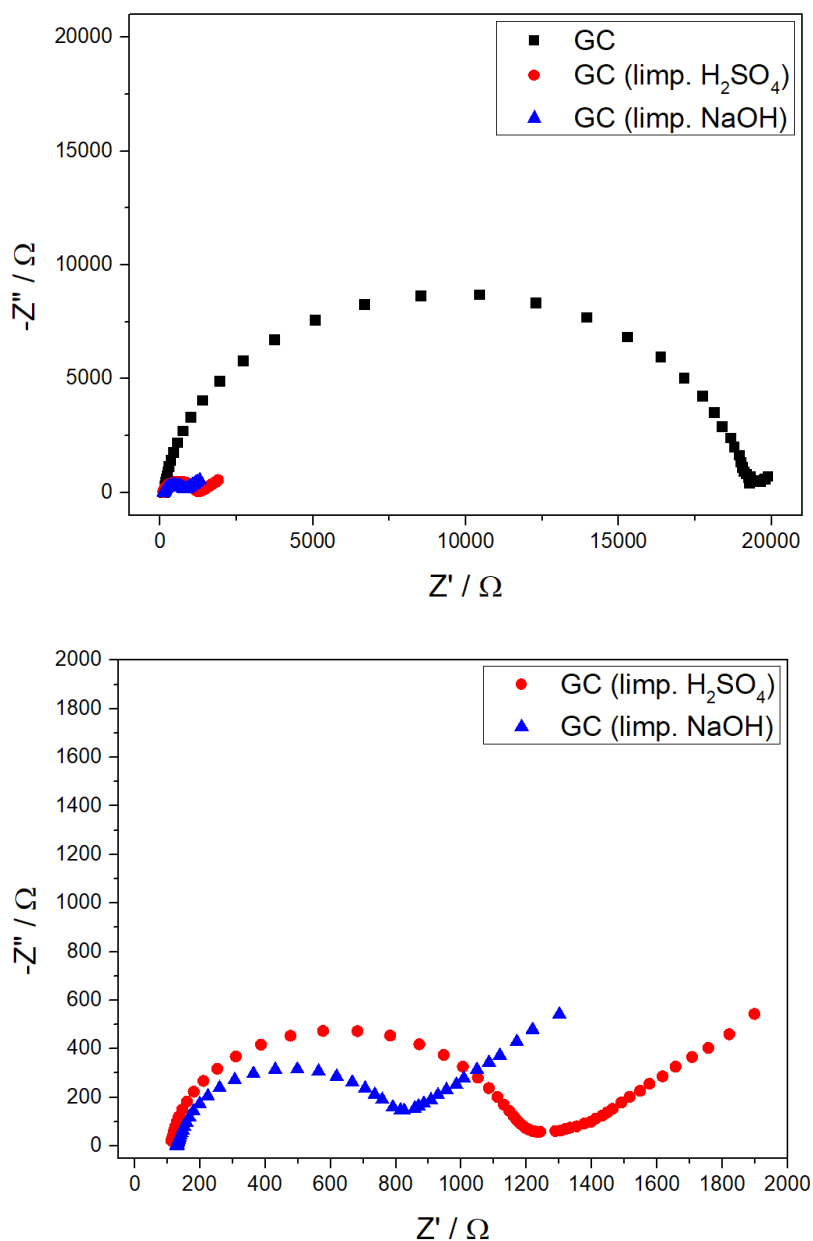
4.1.2.1 Limpeza do eletrodo

Para demonstrar a importância da limpeza eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo, realizamos a impedância eletroquímica do eletrodo (Figura 20).

Há diferentes pré-tratamentos para preparação e ativação da superfície do carbono vítreo para medidas eletroquímicas. A superfície dos eletrodos pode ser preparada por tratamento mecânico, que envolve abrasão com papel abrasivo e polimento com alumina. Outros métodos, como tratamento com laser e irradiação do carbono vítreo com ultrassom, tem sido aplicados para criar superfícies reproduzíveis e ativar a superfície do carbono vítreo. No entanto, o tratamento eletroquímico da superfície é o método mais usado para esse propósito, pois têm mostrado um aumento na atividade dos eletrodos ativados eletroquimicamente em

comparação com os eletrodos pré-tratados mecanicamente (DEKANSKI *et al.*, 2001; WANG; HUTCHINS, 1985).

Figura 20 - Impedância eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo: (preto) limpo apenas com alumina, (vermelho) limpo com alumina seguida de limpeza eletroquímica em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (azul) limpo com alumina seguida de limpeza eletroquímica em NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Autoria própria.

A Impedância eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo em 50 mmol L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{2+/3+} em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹ com variação de frequência de 0,1 Hz a 100 kHz em potencial de circuito aberto (Figura 20) mostrou que o eletrodo de carbono vítreo que foi apenas limpo com alumina apresenta uma resistência a transferência de carga muito maior, em torno de 19000Ω, o eletrodo limpo com H₂SO₄ apresentou uma resistência de 1200Ω enquanto que o eletrodo limpo com NaOH teve a menor resistência 830Ω. O gráfico de Nyquist inclui uma parte semicircular e outra linear. A parte semicircular em altas frequências corresponde a resistência a transferência de carga (R_{ct}) e a parte linear em baixas frequências corresponde ao processo de difusão (AFKHAMI *et al.*, 2016).

Importante ressaltar que os estudos de ANJO (*et al.*, 1989) mostraram que altas concentrações de NaOH tiveram efeitos destrutivos sobre as junções de vidro poroso dos eletrodos de referência. O autor recomenda que soluções 1,0 M de NaOH devem entrar em contato com as junções dos eletrodos de referência apenas pelo menor período de tempo necessário para a ativação. Desse modo, para evitar problemas de corrosão utilizamos neste trabalho NaOH 0,05 mol L⁻¹.

ANJO (*et al.*, 1989) mostrou que a capacitância e a adsorção de dopamina variou muito com a ativação em meio ácido, mas a ativação em meio básico foi sempre pelo menos uma ordem de grandeza menor para capacitância e adsorção. A ativação em base também foi muito mais reprodutível nos três parâmetros testados: (1) reversibilidade, (2) adsorção de dopamina e (3) capacitância do eletrodo.

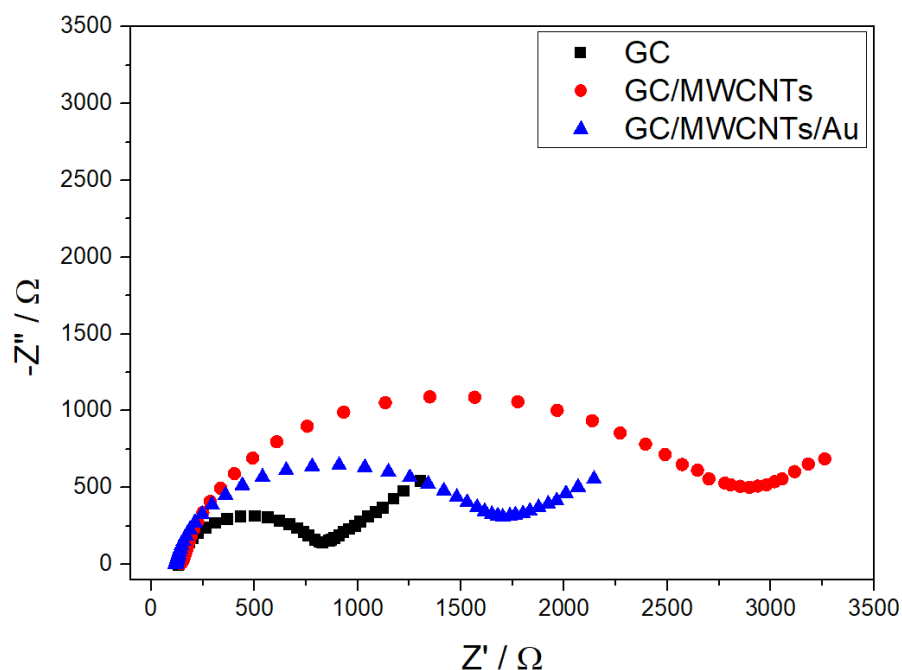
Após a ativação eletroquímica, a superfície do eletrodo de carbono acumula íons carregados e essa propriedade pode explicar o aumento na capacitância aparente do eletrodo. Quando o eletrodo é ativado na base, a adsorção e a capacitância são menores. Provavelmente isso se deve à alta solubilidade do filme superficial a esse pH. A ativação eletroquímica do carbono em solução básica é eficaz na remoção dos produtos da oxidação do eletrodo e também é responsável pela presença de grupos quinona / hidroquinona na superfície do eletrodo (ANJO *et al.*, 1989; NAGAOKA *et al.* 1988).

Assim, decidimos realizar a limpeza em meio básico em todos os eletrodos de carbono vítreo utilizados nas medidas eletroquímicas.

4.1.2.2 Modificação do eletrodo

A etapa seguinte consiste na modificação do eletrodo. A impedância eletroquímica mostra que a presença de nanoestruturas na superfície do eletrodo de carbono vítreo faz com que ocorra um aumento da resistência a transferência de carga (Figura 21), o eletrodo de carbono vítreo sem depósito apresenta uma resistência de 830Ω , enquanto que o eletrodo modificado com MWCNTs tem 2800Ω e o eletrodo modificado com MWCNTs/Au apresenta 1700Ω , mostrando que a presença de nanopartículas de ouro melhora a transferência de carga do eletrodo melhorando a condutividade do eletrodo.

Figura 21 - Impedância eletroquímica para o eletrodo de carbono vítreo sem modificação (preto), modificado com MWCNTs (vermelho) e MWCNTs/Au (azul) na presença de 50 mmol L^{-1} do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2+/3+}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



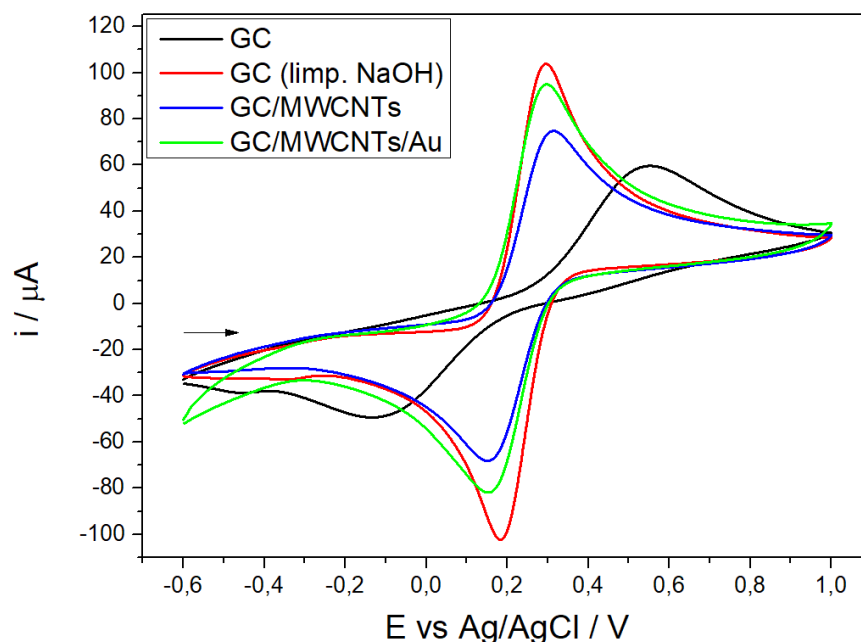
Fonte: Autoria própria.

Conforme discutido anteriormente na seção 4.1.2.1, a ativação eletroquímica do eletrodo em NaOH é eficaz na remoção dos produtos da oxidação do eletrodo e também pode levar a presença de grupos quinona / hidroquinona (ANJO *et al.*, 1989; NAGAOKA *et al.* 1988) estas condições podem favorecer a transferência de

elétrons o que justifica a menor resistência encontrada nessa superfície. Ao adicionarmos os nanotubos de carbono eles podem bloquear os grupos funcionais criados pela base e por isso a resistência é maior.

A voltametria cíclica fornece informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, é uma técnica baseada nos fenômenos que acontecem entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Rapidamente conseguimos informações sobre a termodinâmica dos processos redox, da cinética e da transferência de elétrons (PACHECO *et al.* 2013). Porém, apresenta uma baixa sensibilidade, pois a corrente capacitiva, que é a principal componente da corrente de fundo, constitui a corrente residual que interfere na sensibilidade do sistema.

Figura 22 - Voltametria cíclica a $0,50 \text{ V s}^{-1}$ para os eletrodos de carbono vítreo sem modificação [limpeza apenas com alumina (preto), limpeza com alumina seguida de limpeza eletroquímica em $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (vermelho)], modificado com MWCNTs (azul) e MWCNTs/Au (verde) na presença de 50 mmol L^{-1} do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2+/3+}$ em meio de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros voltamétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2+/3+}$ (Figura 22) podem ser analisados na Tabela 6, em que o valor de ΔE_p para o eletrodo de carbono

vítreo limpo apenas com alumina é bem maior do que para o eletrodo limpo com NaOH, modificado com MWCNTs e com MWCNTs/Au.

Tabela 6- Parâmetros voltamétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2+/3+}$ para os diferentes eletrodos de trabalho (GC; GC/MWCNTs e GC/MWCNTs/Au).

Eletrodo	E_{pc} (mV)	E_{pa} (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pc} (μA)	I_{pa} (μA)	I_{pc}/I_{pa}
GC	-134,6	549,6	684,2	-49,75	59,73	0,8329
GC (limp. eletroquímica NaOH)	183,3	294,2	110,9	-102,7	103,9	0,9884
GC/MWCNTs	151,7	313,0	161,3	-68,09	74,45	0,9146
GC/MWCNTs/Au	153,2	296,1	142,9	-81,82	95,04	0,8609

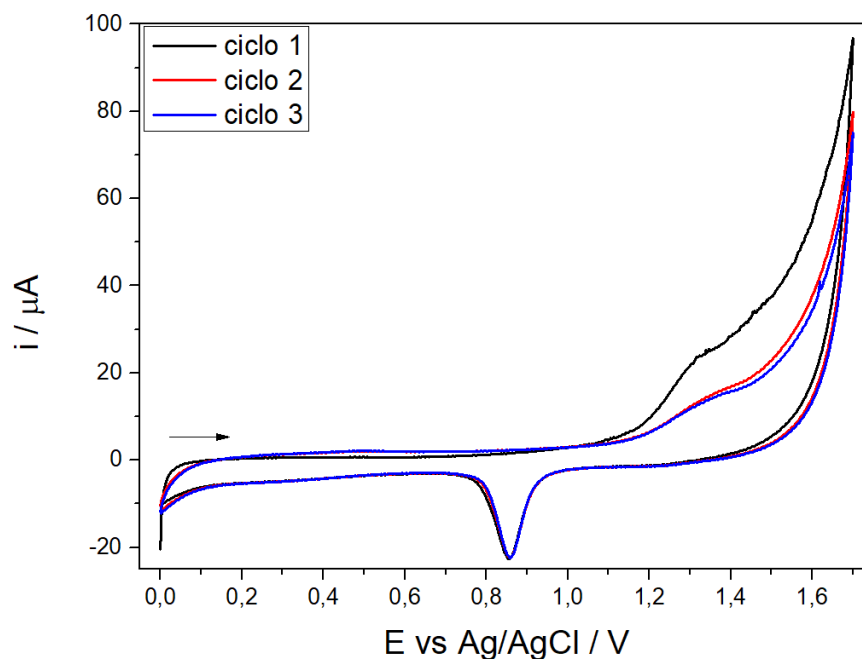
Fonte: Autoria própria

Observando os resultados da Tabela 6 constatamos que o eletrodo de carbono vítreo que foi limpo apenas com alumina apresenta uma separação dos picos redox muito maior (684,2 mV) do que o eletrodo limpo com NaOH (110,9 mV). A limpeza do eletrodo com NaOH e a presença dos nanotubos de carbono reduz o ΔE_p tornando o processo mais reversível. Importante destacar que a modificação do eletrodo é necessária para que não ocorra a saturação rápida da curva analítica promovendo assim uma faixa linear maior (BARD, 2001).

Tendo em vista os resultados obtidos com a limpeza eletroquímica em meio de NaOH, todos os resultados mostrados a seguir foram obtidos com o eletrodo de carbono vítreo limpo em meio básico conforme descrito na parte experimental.

A presença de ouro no eletrodo de trabalho pode ser verificada também por voltametria cíclica em meio de H_2SO_4 conforme mostra a Figura 23.

Figura 23 - Voltametria cíclica em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} do eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs/Au.



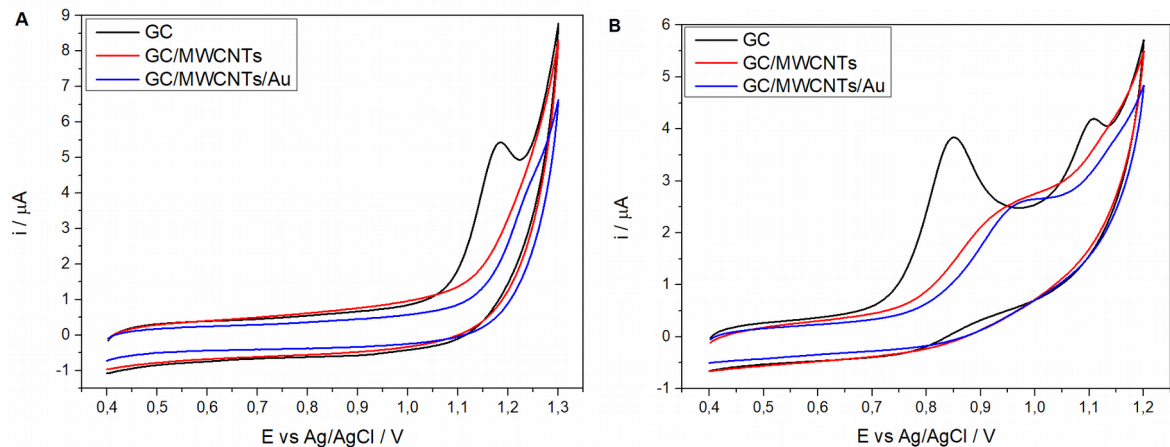
Fonte: Autoria própria.

Conforme podemos verificar na Figura 23, a presença de nanopartículas de ouro no eletrodo modificado é evidenciada na presença de H_2SO_4 , com o processo de oxidação do ouro para óxido de ouro em $1,3 \text{ V}$ e a redução do óxido formado em $0,85 \text{ V}$, como é encontrado na literatura CAETANO (*et al.*, 2017) e como foi demonstrado nos difratogramas de raio-x (Figura 15).

4.2 Comportamento eletroquímico da hidroclorotiazida

A Figura 24 mostra a voltametria cíclica do eletrodo de carbono vítreo sem modificação (preto), modificado com MWCNTs (vermelho) e modificado com MWCNTs/Au (azul), em pH 2 (Figura 24A) e em pH 7 (Figura 24B). Com os resultados obtidos podemos verificar que aparentemente a modificação do eletrodo bloqueia a superfície do eletrodo inibindo a transferência de carga, porém mais a adiante mostraremos que o ganho na curva analítica justifica a modificação do eletrodo.

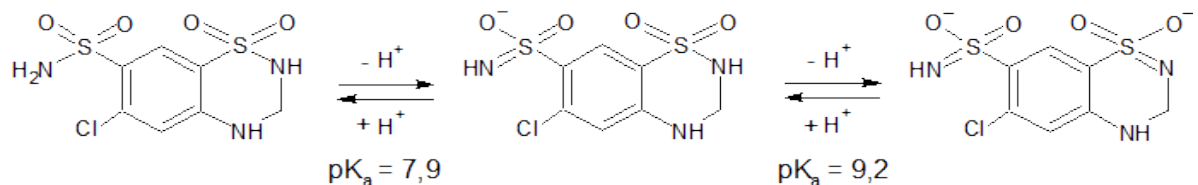
Figura 24 - Voltametria cíclica a 50 mV s^{-1} na presença de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HCTZ do eletrodo de carbono vítreo (GC) sem modificação (preto), modificado com MWCNTs (vermelho) e modificado com MWCNTs/Au (azul), em (A) pH 2 e (B) pH 7.



Fonte: Autoria própria.

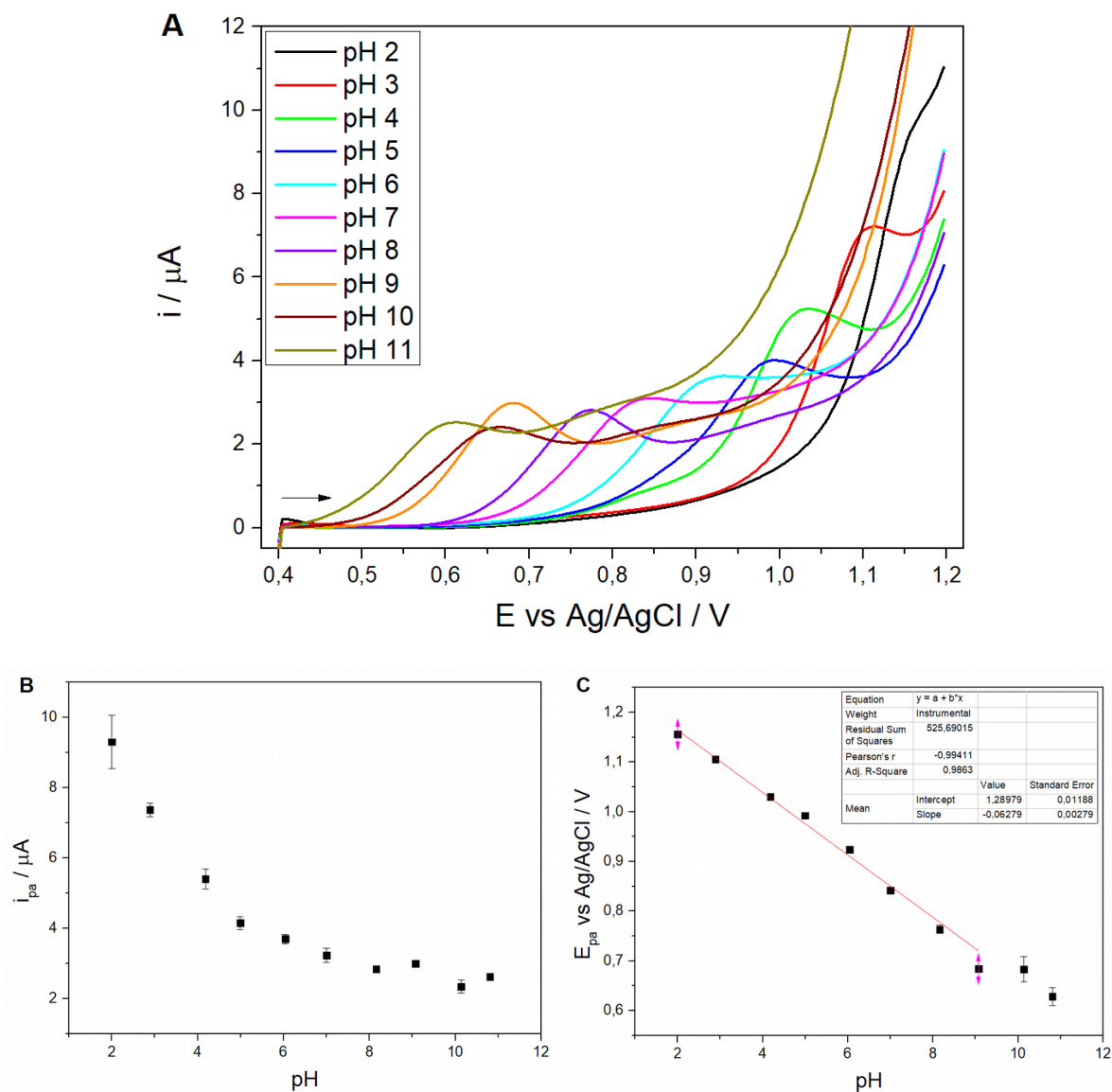
Outro estudo muito importante é o comportamento eletroquímico da HCTZ em relação a mudança de pH. A molécula da HCTZ apresenta $\text{pK}_{a1} = 7,9$ e $\text{pK}_{a2} = 9,2$ (O'NEIL, 2013). Conforme podemos observar na Figura 25, na primeira mudança de pK_a o hidrogênio do grupo amina externa ao anel aromático é liberado da estrutura deixando o oxigênio ligado ao enxofre carregado negativamente, na segunda mudança de pK_a o hidrogênio do grupo amina ligado ao outro grupo sulfato é eliminado criando uma dupla ligação do nitrogênio com o enxofre e o oxigênio fica carregado negativamente.

Figura 25 - Esquema que mostra a variação da estrutura da HCTZ de acordo com seu pK_a .



Fonte: Adaptado de CUDINA *et al.*, 2005; PARMAR, *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2016; O'NEIL, 2013.

Figura 26 - Comportamento eletroquímico da HCTZ de acordo com a variação do pH para o eletrodo modificado com GC/MWCNTsf/Au em solução contendo $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HCTZ, cela termostatzada a 37°C : (A) DPV; (B) Gráfico de i_{pa} vs pH; (C) Gráfico de E_{pa} vs pH.



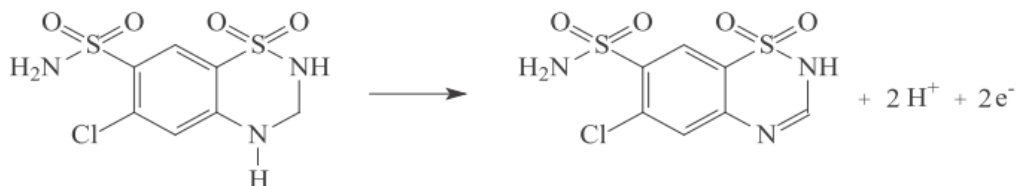
Fonte: Autoria própria.

A Figura 26 mostra o resultado obtido da DPV do eletrodo modificado GC/MWCNTsf/Au em função da variação de pH da solução (de pH 2 a 11) na presença de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HCTZ. Podemos verificar no gráfico que em pH 2 o potencial de pico anódico é $E_{pa} = 1,15 \text{ V}$, além disso a corrente de pico não é bem definida, tanto que percebemos que o desvio padrão associado a esta medida é bem maior do que nos valores dos outros pHs (Figura 26B). Conforme aumentamos o pH, o pico é deslocado para a esquerda (valores menos positivos), quando

atingimos os valores de pK_a da HCTZ, percebemos uma variação na corrente de pico e no formato da curva, no pH 8, notamos que há um pico bem definido em 0,75 V e um ombro em 0,95 V, provavelmente isto ocorre porque em pK_a 7,9 a HCTZ perde um próton e fica carregado negativamente (Figura 25), esta modificação da estrutura pode levar ao surgimento desse segundo pico. No pH 9 podemos verificar que ocorre um aumento da corrente de pico anódica do primeiro pico em 0,70 V e o potencial do ombro é deslocado para 0,85 V. Nos pHs 10 e 11 observamos que o comportamento é semelhante ao pH 9, porém o sinal de corrente é menor. A relação entre o E_{pa} e o pH é linear (Figura 26C), a inclinação é -62,79 (mV por pH). Esses resultados corroboram os resultados encontrados na literatura (BOZAL *et al.*, 2013; RAZAK, 2004).

Uma proposta de mecanismo para a oxidação da HCTZ é demonstrada na Figura 27.

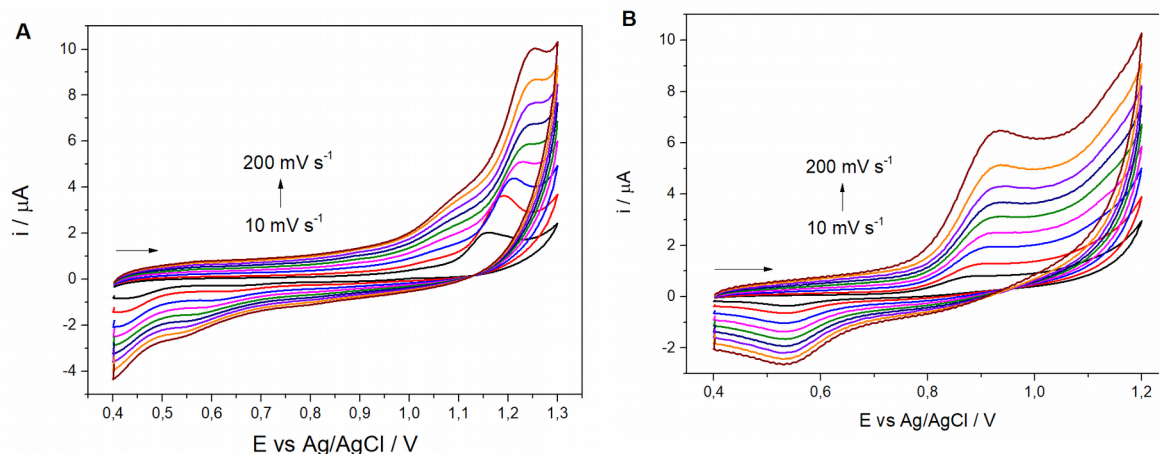
Figura 27 - Esquema do mecanismo de eletrooxidação proposto para a hidroclorotiazida.



Fonte: Adaptado de EISELE *et al.*, 2014; KARIMI-MALEH *et al.*, 2009; RAZAK, 2004.

No processo de oxidação da molécula de HCTZ, a amina secundária localizada no anel é oxidada, ocorrendo a liberação de 2 prótons e 2 elétrons, conforme observamos na Figura 27 (EISELE *et al.*, 2014; KARIMI-MALEH *et al.*, 2009).

Figura 28 - Variação da velocidade de varredura na voltametria cíclica do eletrodo GC/MWCNTsf/Au em solução 10^{-4} mol L $^{-1}$ de HCTZ: (A) pH 2 e (B) pH 7.

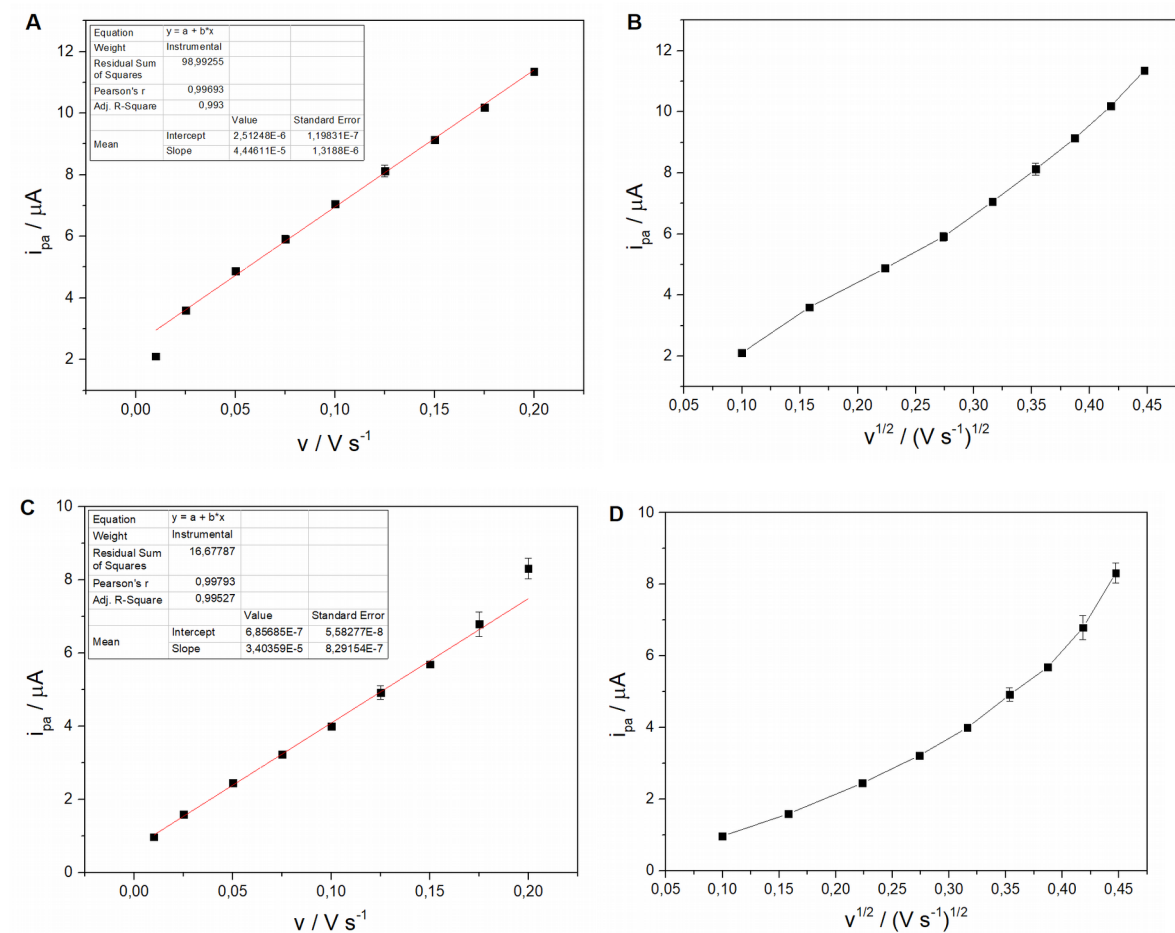


Fonte: Autoria própria.

A Figura 28 mostra os dados obtidos de voltametria cíclica do eletrodo GC/MWCNTsf/Au na presença de 10^{-4} mol L $^{-1}$ de HCTZ nos pHs 2 (Figura 28A) e 7 (Figura 28B) com a variação da velocidade de varredura de 10 a 200 mV s $^{-1}$. Pelos gráficos podemos constatar que o aumento da velocidade de varredura faz com que a corrente de pico anódica e catódica aumentem e provoca um deslocamento do potencial de pico, sendo que o potencial de pico anódico no pH 2 é deslocado no sentido mais positivo (para a direita) e no caso do pH 7 é no sentido menos positivo (para a esquerda). Como o pico de oxidação é mais intenso e mais bem definido, podemos usar esses dados para construir os gráficos mostrados na Figura 29.

A Figura 29 mostra os dados de corrente de pico anódica (i_{pa}) em função da velocidade de varredura (v) (Figura 29A e 29C) e em função da raiz quadrada da velocidade ($v^{1/2}$) (Figura 29B e 29D). Ao analisarmos os dados obtidos podemos observar uma maior linearidade entre i_{pa} e v , sugerindo que o processo é limitado pela cinética de transferência eletrônica no pH 2 e no 7 também. (BARD, FAULKNER, 2001).

Figura 29 - Gráfico de i_{pa} vs v e i_{pa} vs $v^{1/2}$ para eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTsf/Au na presença de 1×10^{-4} mol L⁻¹ de HCTZ: (A) e (B) pH 2; (C) e (D) pH 7.



Fonte: Autoria própria.

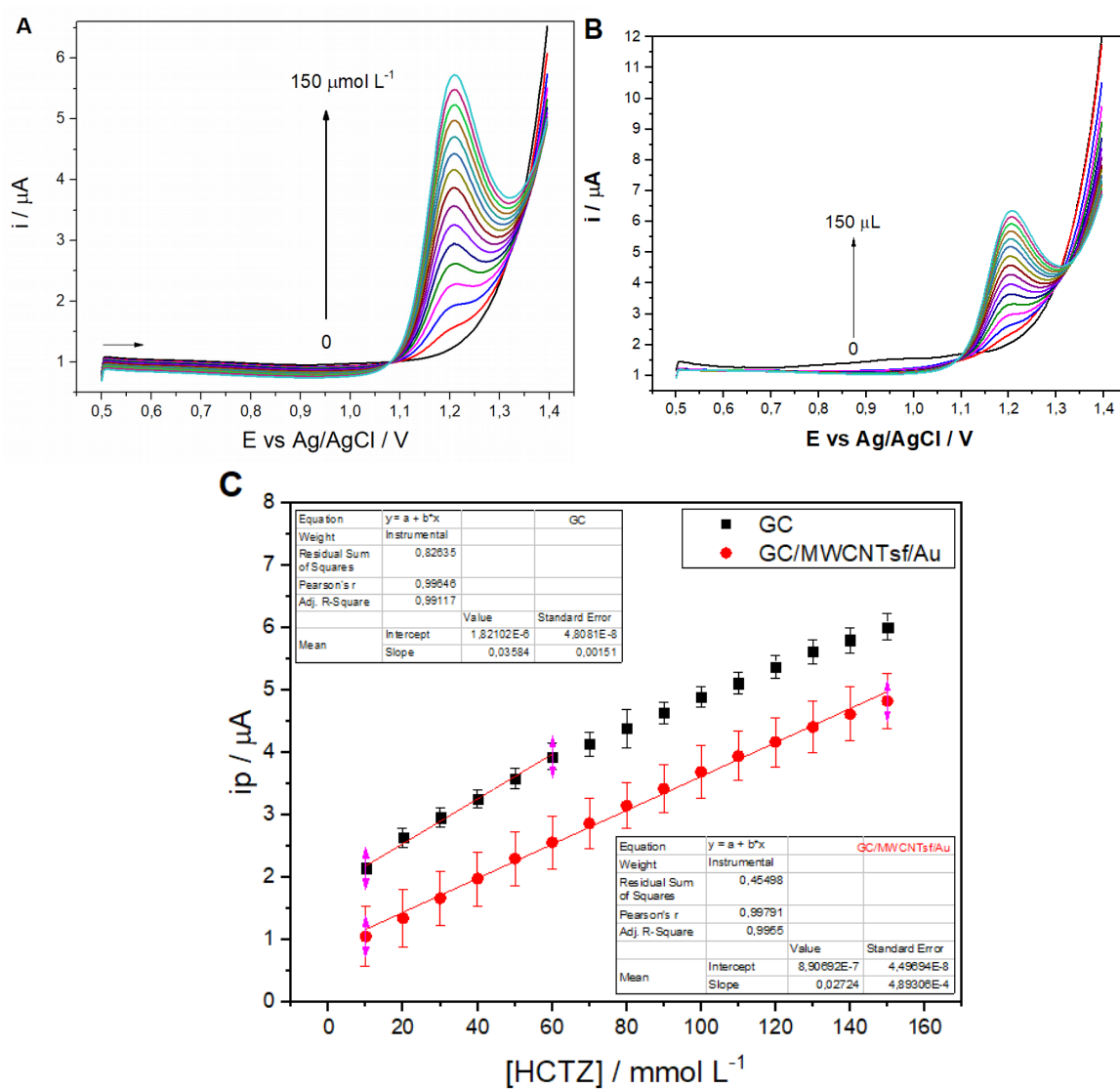
4.3 Determinação da hidroclorotiazida por DPV

Para melhorar a sensibilidade utilizamos as técnicas de pulso, cujo potencial é aplicado em pulsos fazendo com que a corrente capacitiva se extinga mais rapidamente do que a corrente faradaica que é medida ao final da aplicação. No caso da voltametria de pulso diferencial, a amplitude dos pulsos fixos são aplicados sobre uma rampa crescente de potencial, mede-se a corrente antes da aplicação do pulso e após a aplicação e a diferença entre essas correntes é plotada em função do potencial. Conforme o pulso é aplicado a contribuição da corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente, assim escolhendo o tempo apropriado da leitura da segunda corrente temos uma

condição em que a corrente capacitiva pode ser desconsiderada (PACHECO *et al.* 2013).

Levando em conta os aspectos discutidos, determinamos os melhores parâmetros eletroquímicos para a voltametria de pulso diferencial (DPV), obtendo o valor de 0,004V para o degrau de potencial (step) e 0,06 V para a amplitude, estes valores foram usados em todas as curvas analíticas mostradas nas Figuras 30 e 31.

Figura 30- Determinação da curva analítica por Voltametria de Pulso Diferencial em tampão Britton-Robinson pH 2 a 37°C: (A) GC; (B) GC/MWCNTsf/Au; (C) curva analítica.

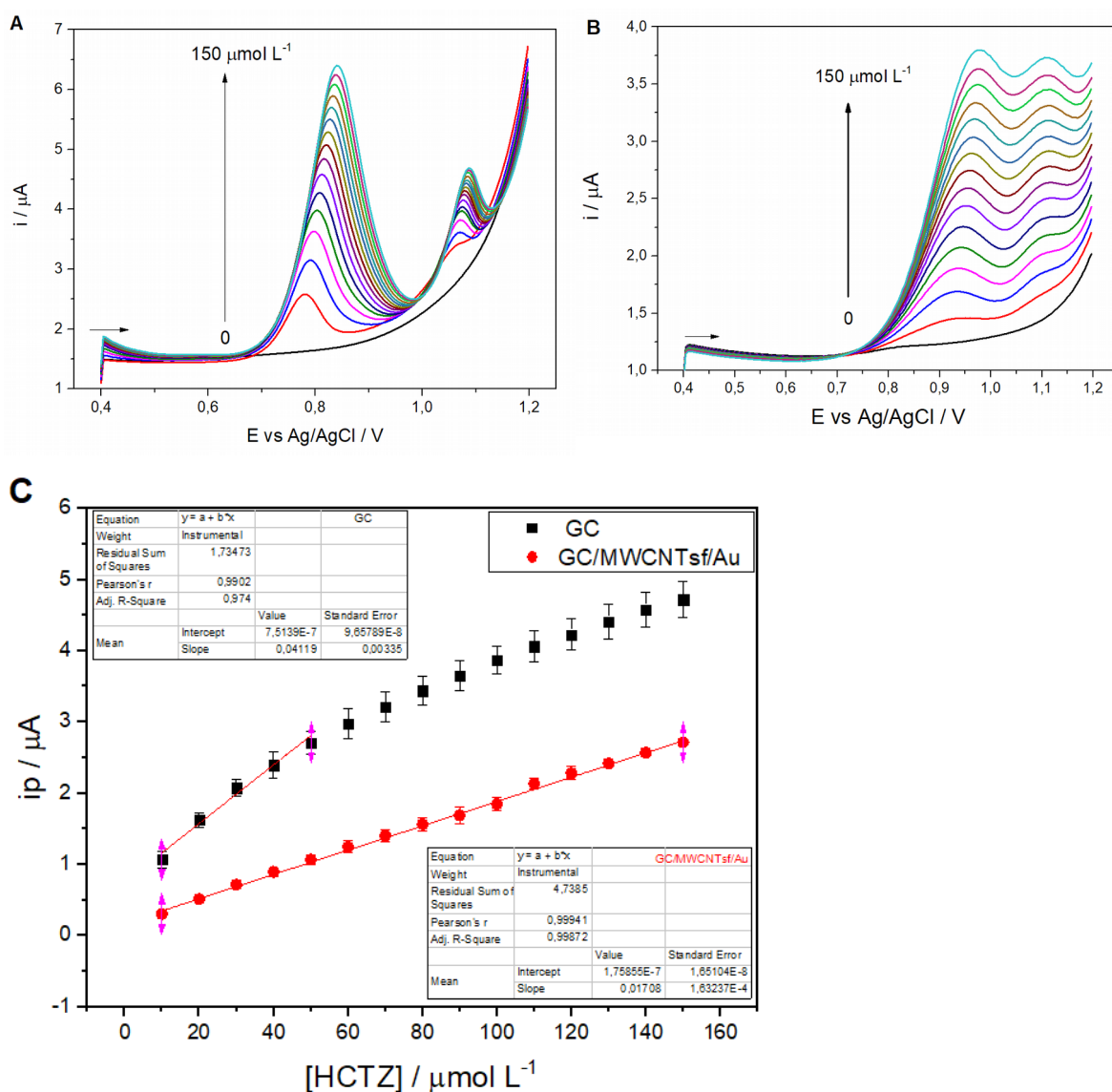


Fonte: Autoria própria.

A Figura 30 mostra os resultados obtidos para a curva analítica em tampão Britton-Robinson pH 2 em cela termostatizada a 37°C do eletrodo sem modificação (Figura 30A) e do eletrodo modificado (Figura 30B).

A Figura 31 mostra os resultados obtidos para a curva analítica em tampão Britton-Robinson pH 7 em cela termostatizada a 37°C do eletrodo sem modificação (Figura 31A) e do eletrodo modificado (Figura 31B).

Figura 31 - Determinação da Curva Analítica por Voltametria de Pulso Diferencial em tampão Britton-Robinson pH 7 a 37°C: (A) GC; (B) GC/MWCNTsf/Au; (C) Curva analítica.



Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros analíticos obtidos pelas curvas obtidas na Figura 30C e 31C são mostrados na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7- Parâmetros analíticos obtidos com eletrodo sem modificação (GC) e com o eletrodo modificado (GC/MWCNTsf/Au).

Eletrodo	pH	Faixa Linear / mol L ⁻¹	Limite de detecção (LD) / mol L ⁻¹	Limite de quantificação (LQ) / mol L ⁻¹
GC	2	1 x 10 ⁻⁵ a 6 x 10 ⁻⁵	6,33 x 10 ⁻⁶	2,11 x 10 ⁻⁵
GC/MWCNTsf/Au	2	1 x 10 ⁻⁵ a 1,5 x 10 ⁻⁴	8,95 x 10 ⁻⁶	2,98 x 10 ⁻⁵
GC	7	1 x 10 ⁻⁵ a 5 x 10 ⁻⁵	6,83 x 10 ⁻⁶	2,28 x 10 ⁻⁵
GC/MWCNTsf/Au	7	1 x 10 ⁻⁵ a 1,5 x 10 ⁻⁴	6,85 x 10 ⁻⁶	2,28 x 10 ⁻⁵

Os resultados obtidos foram satisfatórios considerando que a faixa linear está dentro dos valores usados na elaboração do sistema de liberação controlada da HCTZ. Além disso, os valores obtidos de limite de detecção e de quantificação foram muito próximos, tanto para o eletrodo modificado como para o sem modificação.

4.4 Determinação da hidroclorotiazida por UV-vis

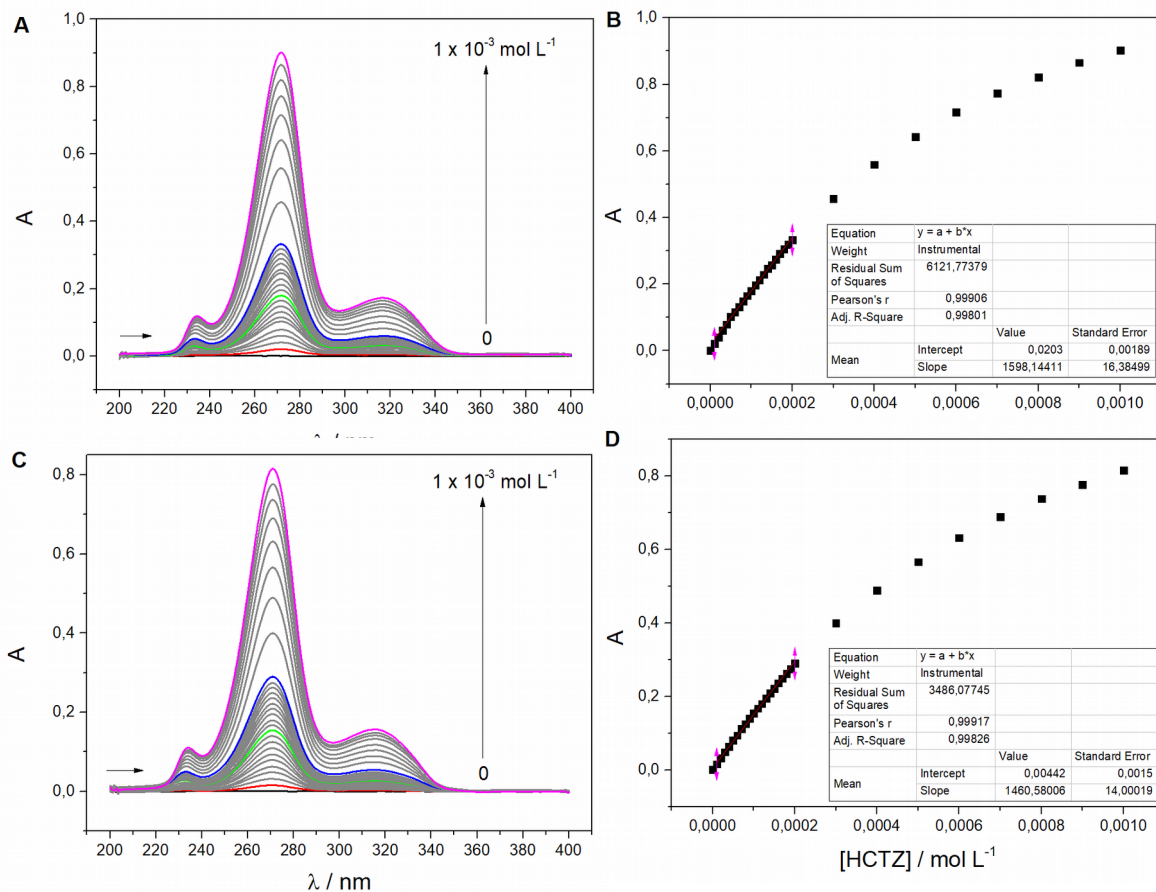
A determinação da hidroclorotiazida também foi realizada por espectroscopia na região do UV-vis, esta técnica apresenta uma boa sensibilidade, sendo a técnica padrão utilizada nos estudos de liberação controlada de fármacos.

As curvas analíticas obtidas no UV-vis para os pH 2 e 7 foram realizadas em cela termostatizada a 37°C em triplicata, os resultados obtidos são mostrados na Figura 32.

A Figura 32A mostra os valores de absorção obtidos em função do aumento da concentração de HCTZ (de 1 x 10⁻⁵ a 1 x 10⁻³ mol L⁻¹) em tampão Britton-Robinson pH 2. Na Figura 32B temos a curva analítica determinada para o comprimento de onda de 271,48 nm, em que $A = 0,0203 + 1598,1441 [HCTZ]$, onde A é a absorção medida e [HCTZ] é a concentração de hidroclorotiazida em mol L⁻¹.

O mesmo procedimento foi realizado para o pH 7 (Figura 32C e 32D) e a curva analítica obtida foi $A = 0,00442 + 1460,58006 [HCTZ]$.

Figura 32 - Curva analítica determinada por Espectroscopia de Absorção no UV-vis a 37 °C em tampão Britton-Robinson: (A e B) pH 2 e (C e D) pH7. A concentração de HCTZ variou de 1×10^{-5} a 1×10^{-3} mol L⁻¹: (preto) medida do branco; (vermelho) 1×10^{-5} mol L⁻¹ de HCTZ; (verde) 1×10^{-4} mol L⁻¹ de HCTZ; (azul) 2×10^{-4} mol L⁻¹ de HCTZ e (magenta) 1×10^{-3} mol L⁻¹.



Fonte: Autoria própria.

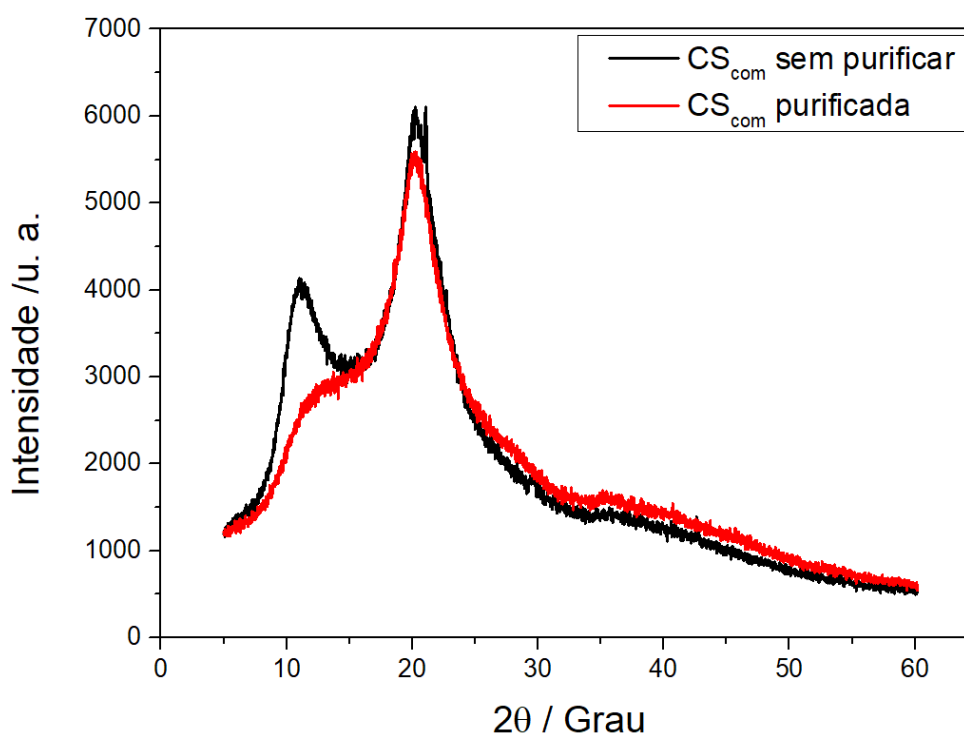
Para o pH 2 o limite de detecção foi de $1,09 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e o limite de quantificação $3,63 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, enquanto que para o pH 7 encontramos o LD de $7,99 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, LQ de $2,66 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a faixa linear obtida para ambos pHs foi de 1×10^{-5} a 2×10^{-4} mol L⁻¹.

Estas retas de calibração podem ser utilizadas para calcular a concentração das amostras nos testes de liberação.

4.5 Caracterização da Quitosana

As propriedades da quitosana incluindo a solubilidade, são fortemente dependentes do grau médio de carga do polímero e de sua distribuição ao longo da cadeia (SIGNINI; CAMPANA, 2001). Para garantir que não ocorra a presença de contaminantes no sistema de liberação controlada do fármaco, a quitosana comercial foi purificada, conforme descrito no item materiais e métodos e o difratograma de raios-X foi realizado.

Figura 33 - Difratograma de raio-X da quitosana comercial sem purificação (preto) e purificada (vermelho).



Fonte: Autoria própria.

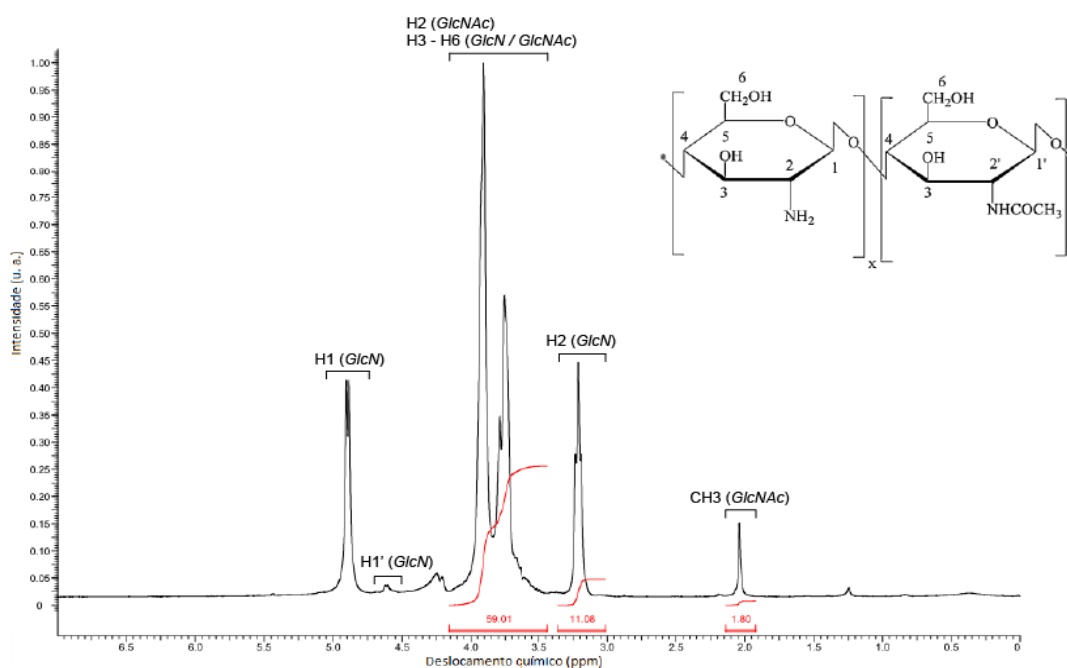
Observa-se que o perfil do difratograma se altera (Figura 33), mostrando que o processo de purificação da quitosana minimiza a presença de impurezas responsáveis pelo pico (linha preta) na região de $2\theta = 10^\circ$. Por outro lado, observa-se o pico $2\theta = 20^\circ$ não se alterou, já que este é um pico característico da quitosana, mostrando que não ocorreu modificação estrutural. Estes dados são compatíveis com resultados da literatura (SIGNINI; CAMPANA, 2001).

A quitosana é um polissacarídeo obtido por desacetilação parcial ou completa da quitina, e sua estrutura e propriedades moleculares são amplamente afetadas pelo grau de desacetilação. Por esta razão, é necessário determinar exatamente o grau de desacetilação. Outros métodos como a titulação coloidal, análise da razão entre carbono e nitrogênio por análise elementar e razão de absorvância no espectro infravermelho são usadas para determinar o grau de desacetilação, no nosso experimento utilizamos a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) conforme descrito anteriormente. Esta técnica utiliza uma pequena quantidade de quitosana e tem a vantagem de que como a quitosana é extremamente higroscópica, é muito difícil eliminar completamente o efeito da umidade nos métodos convencionais, no método que usa o ^1H RMN esse efeito é eliminado (HIRAI *et al.*, 1991).

Para calcular o grau de acetilação da quitosana comercial purificada foi obtido o espectro da ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN), mostrado na Figura 34.

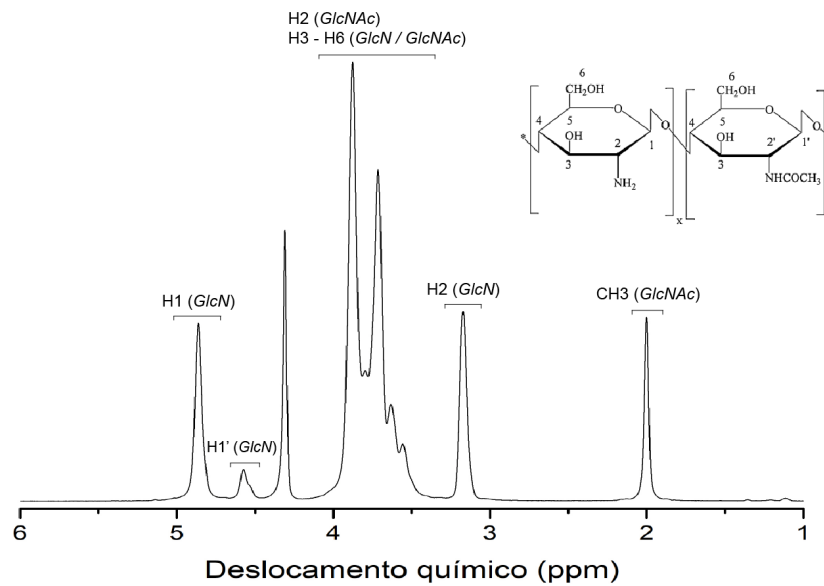
Utilizando a equação 1 para a quitosana comercial purificada encontramos o valor de grau de acetilação de 5%.

Figura 34 - ^1H RMN da quitosana comercial purificada.



Fonte: Autoria própria.

Figura 35 - ^1H RMN da quitosana de alta massa molar.



Fonte: Autoria própria.

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado para a quitosana com alta massa molar sintetizada pelo Dr. Danilo Martins dos Santos em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana-Filho, o resultado da ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) é mostrado na Figura 35.

Utilizando a equação 1 para a quitosana comercial purificada encontra-se o valor de grau de acetilação de 5%. Para a quitosana de alta massa molar o grau de acetilação foi de 17,8% e para a quitosana quaternizada foi 23,2%. A comparação dos dados obtidos é detalhada na Tabela 8.

Para determinar as massas molares médias foi realizada a determinação da viscosidade intrínseca das amostras (η). A massa molar viscosimétrica média (M_v) foi determinada com os parâmetros de Mark-Houwink-Sakurada (KNAUL *et al.*, 1998) (K' e α), específicos para cada polímero, solvente e temperatura. Estes coeficientes foram determinados por RINAUDO (*et al.*, 1993). Neste trabalho foram realizadas análises para a quitosana comercial, para a quitosana de alta massa molar e para a quitosana quaternizada. Os dados são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 8- Dados experimentais das Quitosanas comercial, com alta massa molar e quaternizada.

Amostra	Grau de acetilação (%)	Grau de desacetilação (%)	Viscosidade Intrínseca (mL g⁻¹)	Mv (g mol⁻¹)
Quitosana comercial	5	95	302	50 200
Quitosana com alta massa molar	17,8	82,2	1768	576 470
Quitosana quaternizada	23,2	-	992	468 000

Fonte: Autoria própria.

Os dados mostrados na Tabela 8 evidenciam que as quitosanas obtidas em laboratório apresentam uma massa molar cerca de dez vezes maior do que a quitosana comercial (CS_{com}), essa maior massa pode aumentar a quantidade de fármaco carregado, por isso em todo o desenvolvimento do sistema comparamos os resultados obtidos com a quitosana comercial. O grau de desacetilação da quitosana quaternizada não foi calculado, pois é necessário descontar os grupos quaternizados para obter o valor correto de grau de desacetilação para esta quitosana.

A reação de N-desacetilação, uma das principais reações de derivatização da quitina, resulta na hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc e a formação de unidades GlcN (Figura 10), quando essa conversão atinge 40-60%, o produto é denominado quitosana, o qual apresenta solubilidade em soluções aquosas diluídas de ácidos, tais como ácido glutâmico, clorídrico, láctico e acético, devido à protonação dos grupos $-NH_2$ (RINAUDO *et al.*, 1999; KUMAR, 2000). Quitosanas com um grau relativamente baixo de desacetilação (40%) são solúveis até pH 9, enquanto que quitosanas com um grau de desacetilação de cerca de 85% são solúveis até um pH de 6,5. A solubilidade das quitosanas também é bastante influenciada pela adição de sal à solução. Quanto maior a força iônica, menor a solubilidade. A viscosidade da solução de quitosana aumenta com o aumento da concentração de quitosana e diminui a temperatura. A viscosidade também aumenta com a aumento do grau de desacetilação. Isto é devido às diferentes conformações da molécula de quitosana alta e baixa desacetilada. Em um alto grau de desacetilação, onde a molécula é altamente carregada, a quitosana tem uma conformação estendida com uma cadeia flexível, enquanto que em um menor grau

de desacetilação, a molécula de quitosana adota uma forma mais semelhante a uma haste ou uma forma espiralada devido a uma carga mais baixa (ILLUM, 1998).

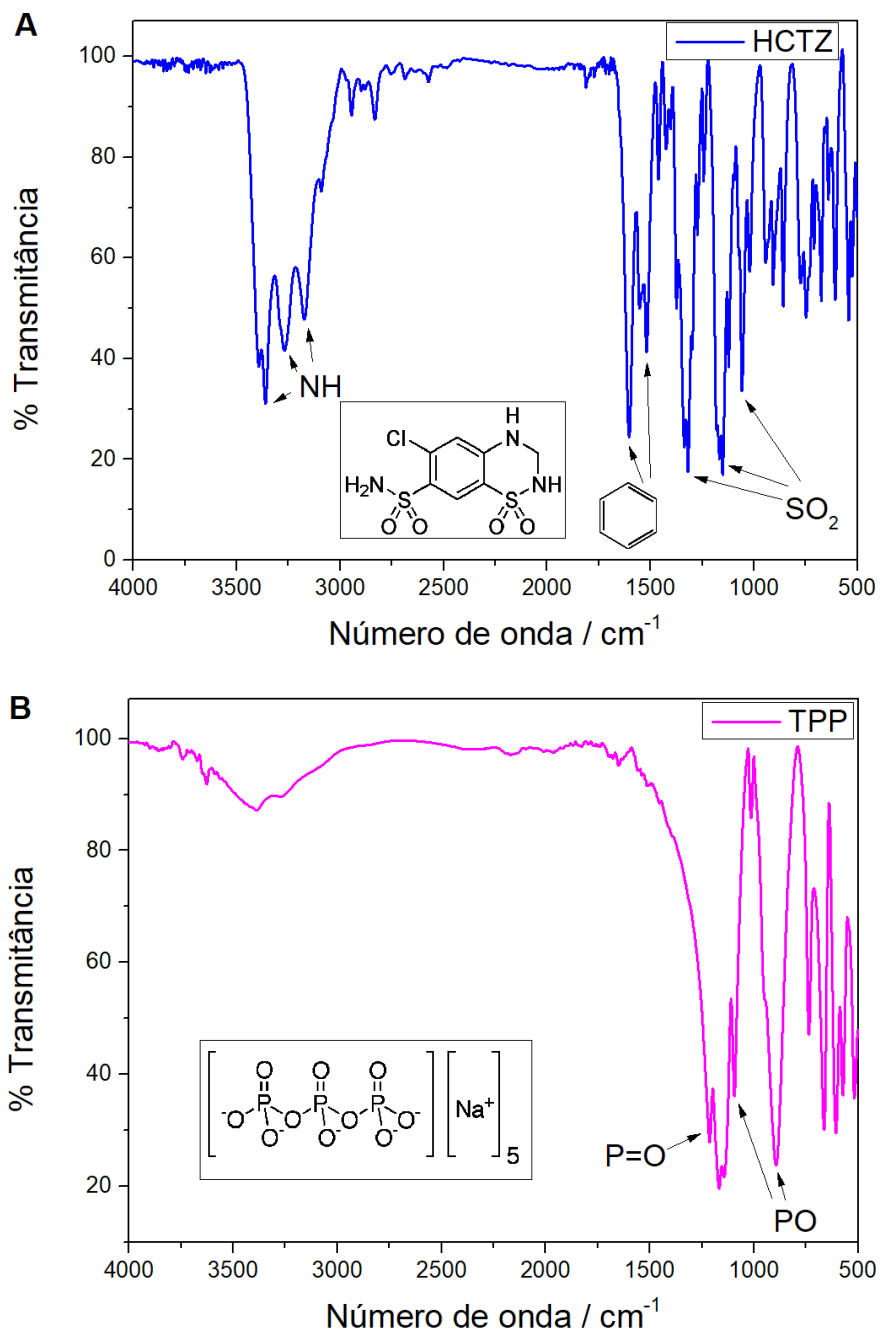
4.6 Otimização do sistema de liberação controlada

4.6.1 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para verificar a presença dos componentes no sistema desenvolvido, foram feitos experimentos com a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

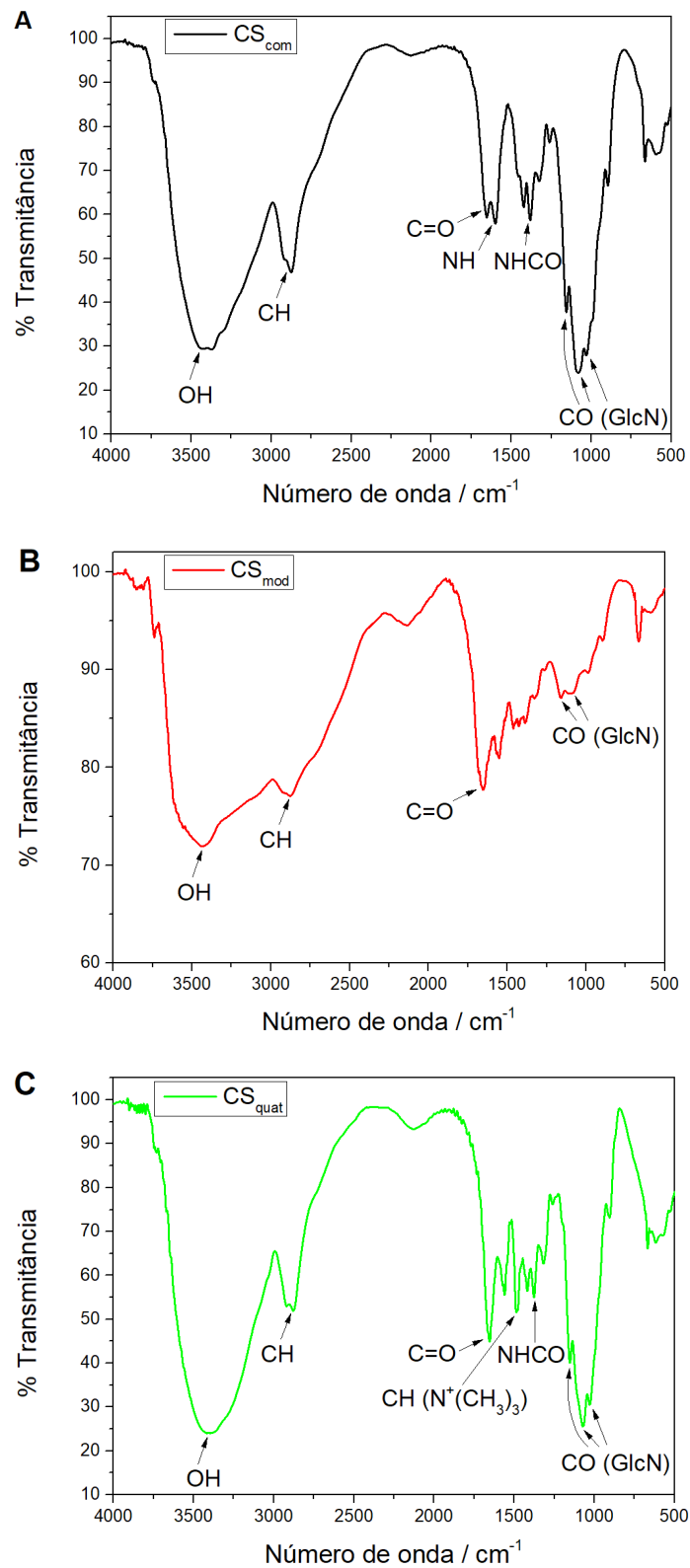
A Figura 36A mostra o espectro de absorção na região do infravermelho da hidroclorotiazida com os picos característicos relacionados com: vibrações de alongamento do grupo NH- em 3363, 3264 e 3172 cm^{-1} , estiramento do CH- em 3098 cm^{-1} , o estiramento CH_2 em 2964 e 2863 e alongamento da ligação C=C em 1604 e 1519 cm^{-1} . Além destes, observa-se também os picos característicos do SO_2 em 1329 cm^{-1} correspondendo às vibrações de alongamento assimétricas do SO_2 e outros dois picos um em 1171 e outro em 1060 cm^{-1} para as vibrações de estiramento simétrico de SO_2 (SULTAN *et al.*, 2017). O tripolifosfato de sódio (Figura 36B) apresenta um pico em 1215 cm^{-1} característico da ligação P=O, e dois picos um em 1094 e outro em 894 cm^{-1} que são devidos à ligação PO.

Figura 36 - Espectros de FTIR para: (A) hidrocortiazida (HCTZ) e (B) tripolifosfato de sódio (TPP).



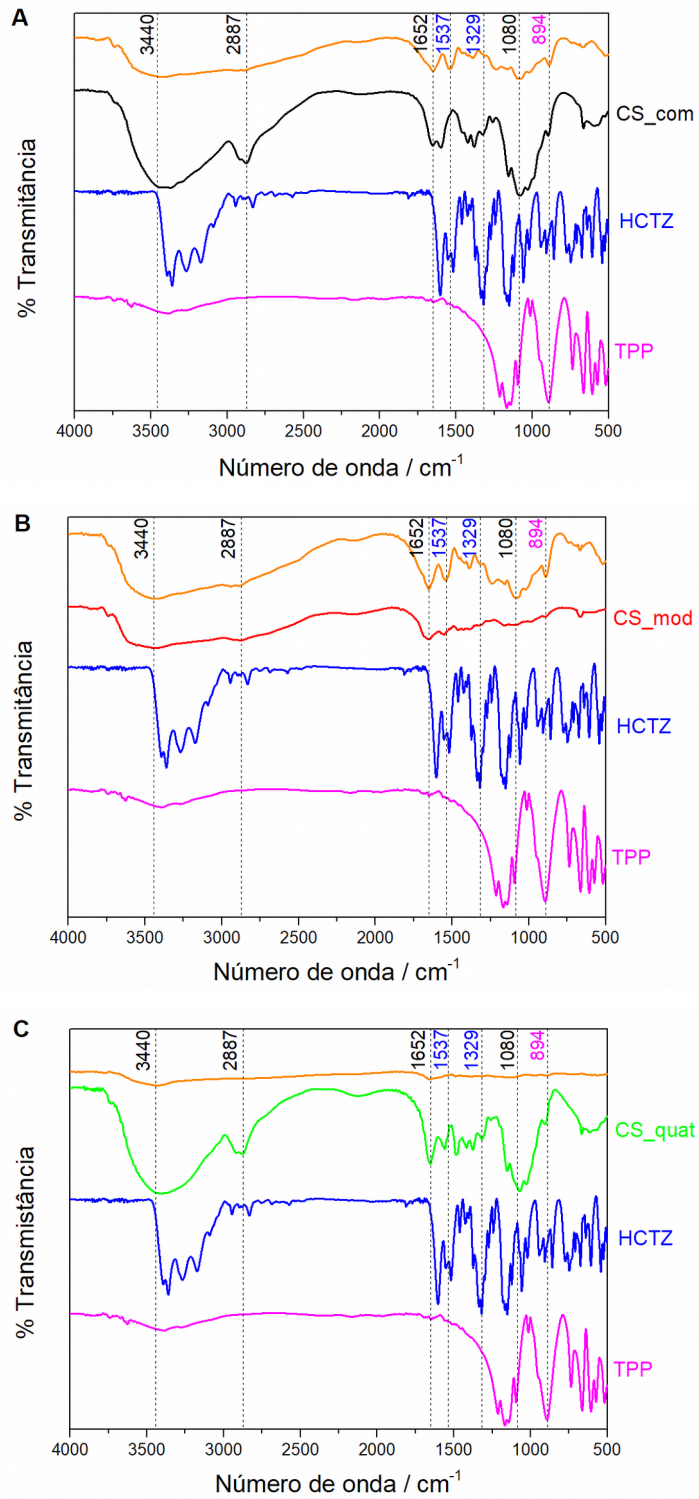
Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Espectros de FTIR referentes à: (A) quitosana comercial purificada (CS_{com}); (B) quitosana com alta massa molar (CS_{mod}); (C) quitosana quaternizada (CS_{quat}).



Fonte: Autoria própria.

Figura 38 - Espectros de FTIR do sistema contendo 10 mL de quitosana; 4,5 mg de HCTZ e 4 mL de TPP: (A) CS_{com}, (B) CS_{mod} e (C) CS_{quat}.



Fonte: Autoria própria.

Comparando os espectros de infravermelho das três quitosanas utilizadas (Figura 37) observa-se que não há muita diferença estrutural, exceto a quitosana quaternizada que apresenta um pico em 1483 cm^{-1} que corresponde a ligação CH do grupo ($^{-+}\text{N}(\text{CH}_3)_3$). A banda intensa em 3440 cm^{-1} corresponde ao alongamento axial do grupo OH que se sobrepõe à banda de alongamento NH; o estiramento CH em 2887 cm^{-1} ; uma banda em 1652 cm^{-1} devida ao estiramento C=O; a flexão do NH aparece em 1600 cm^{-1} ; o estiramento NHCO da amida em 1377 cm^{-1} ; as bandas em 1157 , 1080 e 1030 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento de unidades CO do grupo GlcN que é um dos grupos formadores da quitosana (2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose) (SANTOS *et al.*, 2016).

Os espectros de infravermelho dos sistemas desenvolvidos neste trabalho são mostrados na Figura 38, na qual podemos destacar os seguintes picos:

- Quitosana: alongamento axial do grupo OH em 3440 cm^{-1} ; o estiramento CH em 2887 cm^{-1} ; estiramento C=O em 1652 cm^{-1} ; as bandas em 1157 , 1080 e 1030 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento de unidades CO do grupo GlcN que é um dos grupos formadores da quitosana (2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose);
- Hidroclorotiazida: os picos referentes ao alongamento C=C do anel aromático da HCTZ foram convertidos em um pico em 1537 cm^{-1} ; as vibrações de alongamento assimétricas do SO_2 em 1329 cm^{-1} ;
- Tripolifosfato: o pico em 894 cm^{-1} que são característico da ligação P=O.

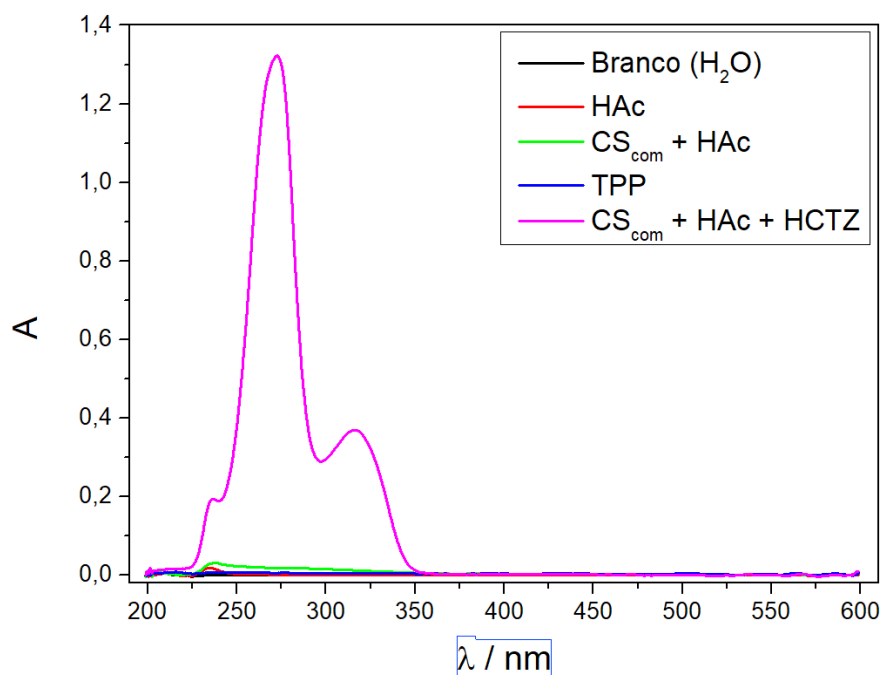
Com isso, mostrou-se a possibilidade do encapsulamento da HCTZ na matriz contendo diferentes tipos de quitosana, embora o sinal da quitosana quaternária tenha intensidade menor ao ampliarmos a região verificamos os menos sinais que foram observados nos outros sistemas. A diminuição da intensidade do sinal de absorção deve, provavelmente, estar relacionada ao fato de se utilizar pouca quantidade da amostra na elaboração da pastilha de KBr.

4.6.2 Detecção da liberação por UV-vis

Todos os estudos iniciais de otimização de qual quitosana escolher para o desenvolvimento do sistema bem como das quantidades de quitosana, de tripolifosfato e de hidroclorotiazida foram realizados com o acompanhamento por UV-vis usando diálise.

Antes de iniciar os estudos de liberação controlada, é necessário verificar se os componentes presentes na composição do sistema desenvolvido interferem nas análises de espectroscopia de absorção no UV-vis. Para isto foram obtidos os espectros da água (branco), do ácido acético (HAc) usado para solubilizar a quitosana comercial (CS_{com}), da solução contendo quitosana e ácido acético (CS_{com} + HAc), do tripolifosfato (TPP) e da solução contendo quitosana, ácido acético e hidroclorotiazida (CS_{com} + HAc + HCTZ), os resultados são mostrados na Figura 39.

Figura 39 - Espectros de absorção no UV-vis dos componentes do sistema de liberação controlada de hidroclorotiazida.

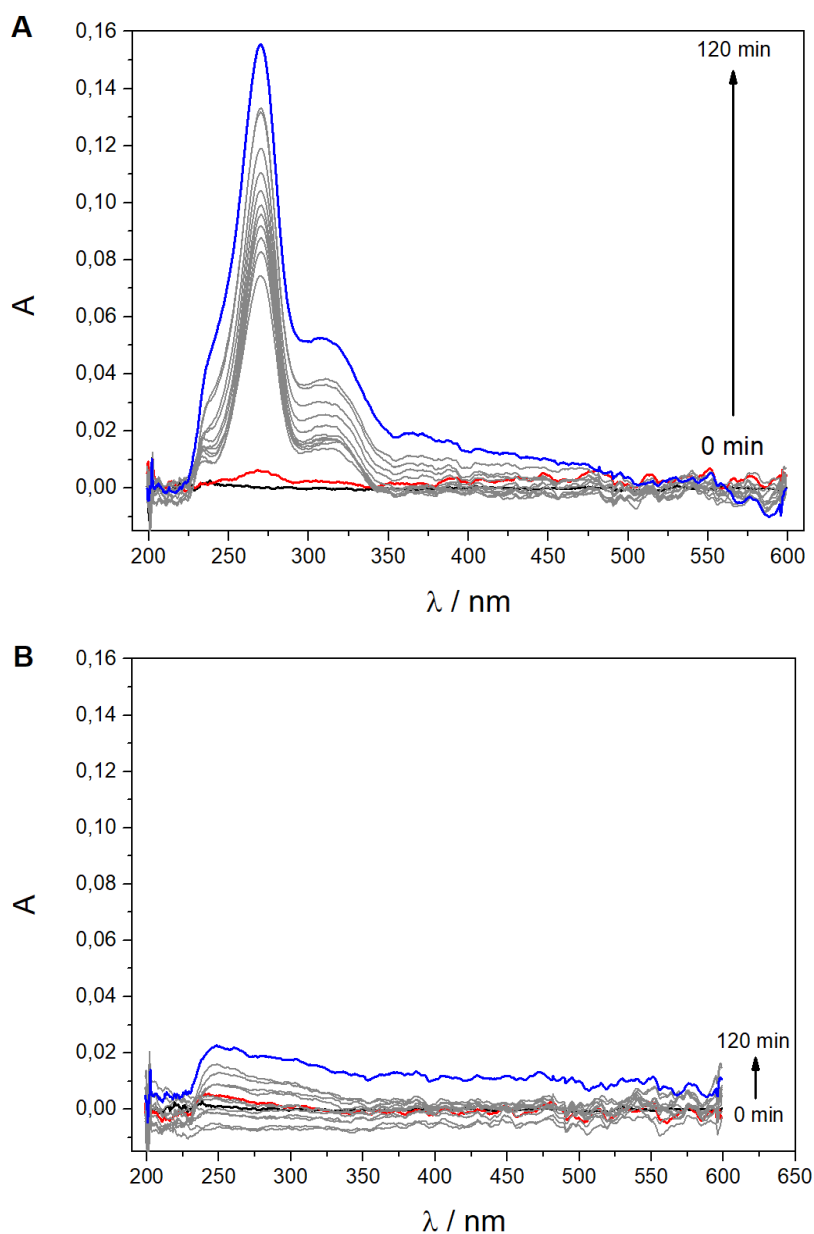


Fonte: Autoria própria.

A Figura 39 mostra que o ácido acético (vermelho) apresenta um sinal fraco de absorbância na região de 240 nm, a solução de quitosana em ácido acético

(verde) também apresenta um sinal fraco na região de 240 nm e o tripolifosfato (azul) não apresenta um sinal significativo de absorção na região analisada. Contudo, quando a hidroclorotiazida é acrescentada na solução contendo quitosana dissolvida em ácido acético (magenta), observamos que um sinal intenso é obtido mostrando o espectro característico da HCTZ.

Figura 40 - Espectros de UV-vis em função do tempo: (A) 10 mL de solução de quitosana comercial purificada, 4,5 mg de hidroclorotiazida e 4 mL de tripolifosfato e (B) 10 mL de solução de quitosana comercial purificada e 4 mL de tripolifosfato.

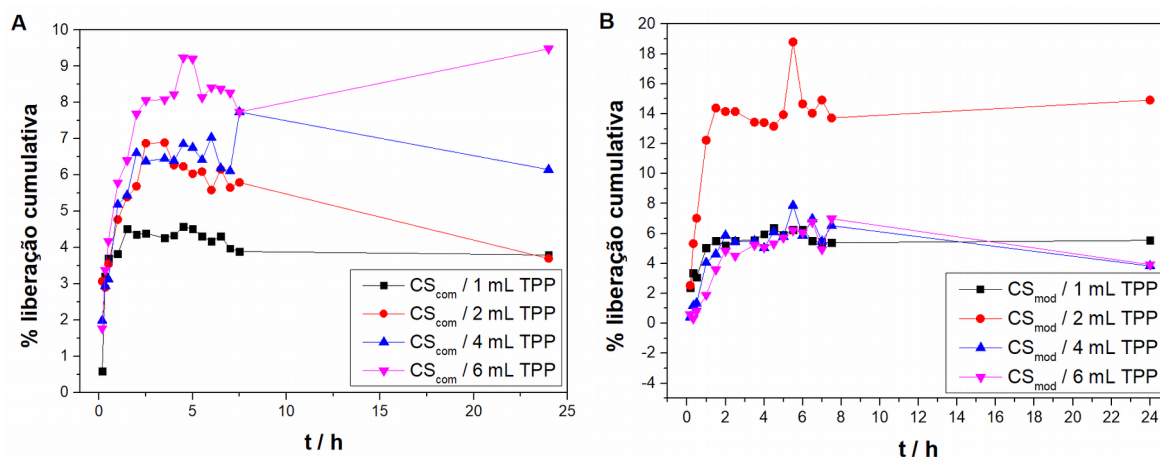


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 40A pode-se observar o perfil da liberação da hidroclorotiazida em tampão Britton-Robinson pH 2. O sistema de liberação controlada foi obtido pela mistura de 10 mL de solução de quitosana comercial purificada na concentração de 2 mg mL⁻¹ em ácido acético 1%, com 4,5 mg de hidroclorotiazida e posterior gotejamento de 4 mL de solução 4,53 mg mL⁻¹ de tripolifosfato na vazão de 1 mL min⁻¹, a Figura 40B mostra o perfil do sistema sem a presença da HCTZ, mostrando que o sinal intenso obtido no comprimento de onda de 271,48 nm é devido à presença da HCTZ.

Diversos estudos foram realizados a fim de determinar qual a melhor quantidade de cada componente para melhorar o sistema de liberação. O primeiro estudo foi feito utilizando quantidades diferentes de TPP. Como a quitosana comercial é solúvel em pH ácido, os primeiros estudos foram realizados em tampão Britton-Robinson pH 2.

Figura 41 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado com diferentes quantidades de tripolifosfato (1, 2, 4 e 6 mL). (A) Quitosana comercial purificada e (B) quitosana de alta massa molar. Gotejamento do TPP a 1 mL min⁻¹. Comprimento de onda fixo em 271 nm.

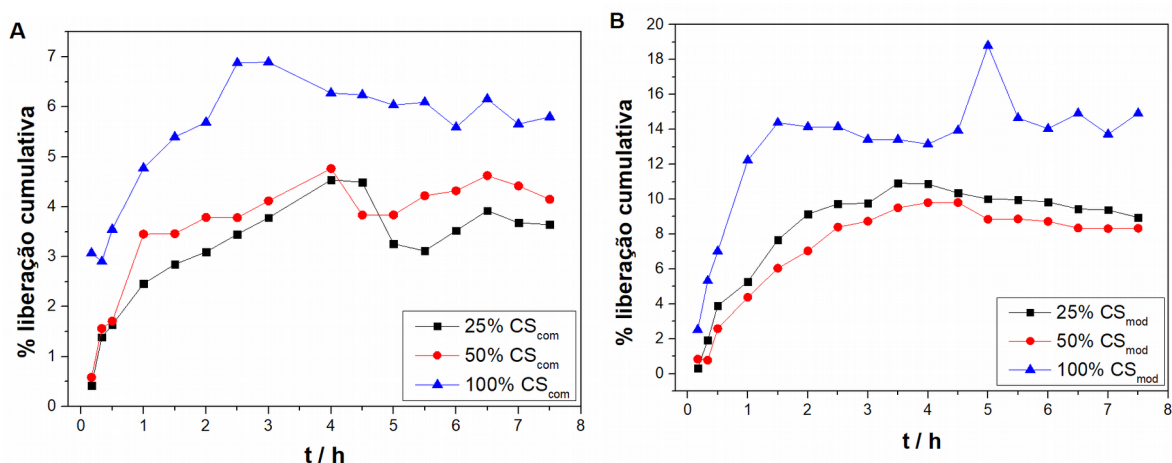


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 41 verificamos que no caso da quitosana comercial conforme aumentamos a quantidade de TPP na amostra a quantidade cumulativa liberada é maior. Enquanto que para a quitosana de alta massa molar a quantidade de 2 mL de

TPP apresentou maior liberação cumulativa (14%), sendo que as outras amostras tiveram resultados muito semelhantes, em torno de 4 a 6% de liberação.

Figura 42 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado com diferentes quantidades de quitosana (25, 50 e 100%), todas com 2 mL de TPP. (A) Quitosana comercial purificada e (B) quitosana de alta massa molar. Gotejamento do TPP a 1 mL min⁻¹. Comprimento de onda fixo em 271 nm.

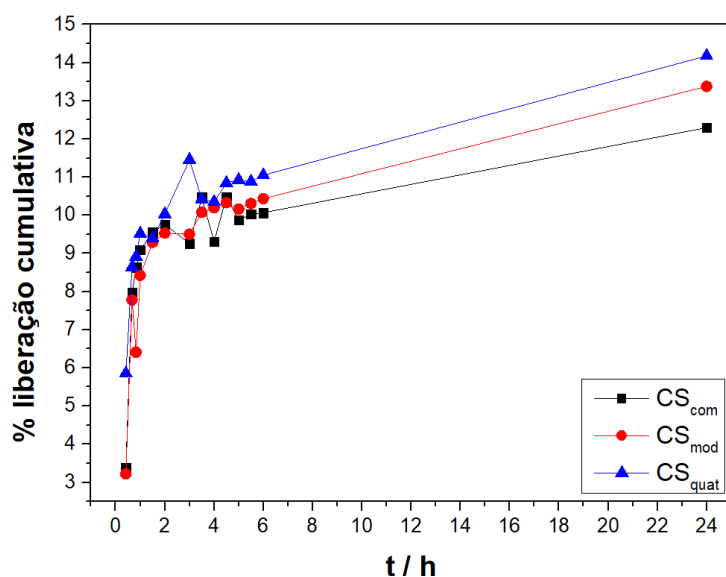


Fonte: Autoria própria.

A Figura 42 mostra os resultados obtidos alterando a concentração de quitosana na elaboração do sistema. Para ambas amostras, ao diminuir a quantidade de quitosana percebemos que ocorre uma diminuição da porcentagem de liberação cumulativa, porém a CS_{mod} apresentou maiores valores do que a CS_{com}. Além disso, a CS_{mod} apresentou uma regularidade maior nos pontos obtidos.

Outro teste realizado foi a avaliação da liberação do fármaco em tampão Britton-Robinson pH 7. Foram preparados 3 sistemas, um contendo quitosana comercial purificada, outro contendo quitosana com alta massa molar e um terceiro com quitosana quaternizada. O intuito aqui era, além de verificar a liberação no pH que simula o intestino, observar também se a utilização de uma quitosana com carga (quitosana quaternizada) poderia levar a uma interação mais efetiva com o medicamento e a um aumento no tempo de sua liberação. Os resultados são exibidos na Figura 43.

Figura 43 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado com diferentes quitosanas (CS_{com} ; CS_{mod} e CS_{quat}), todas com 4 mL de TPP. Gotejamento do TPP a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento de onda fixo em 271 nm.

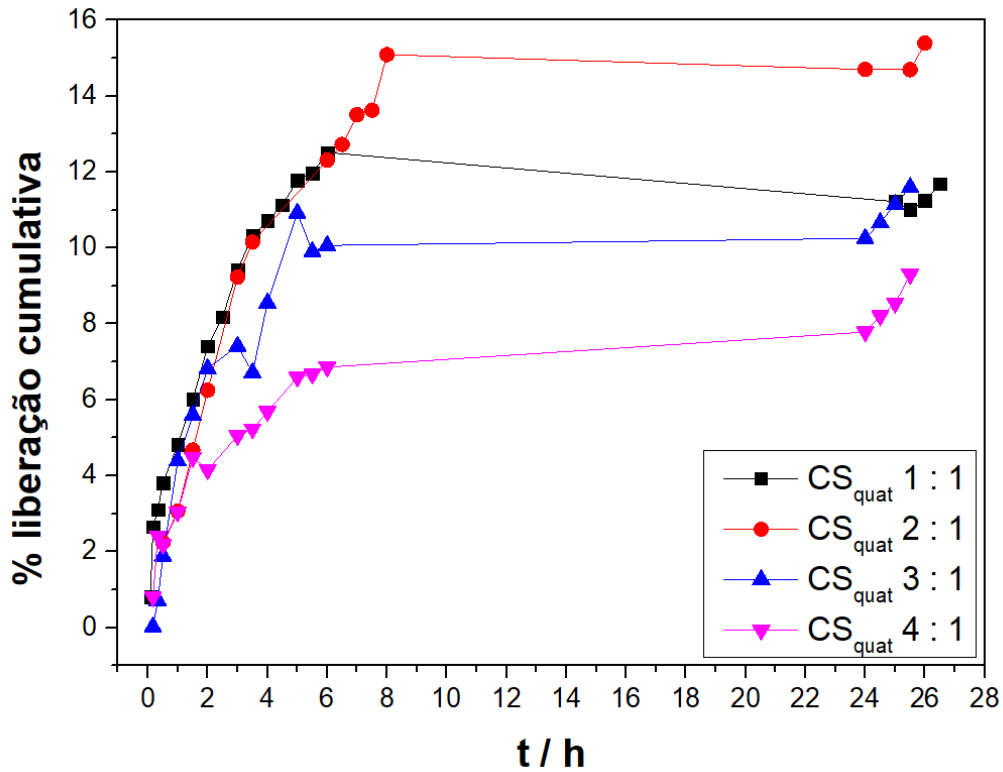


Fonte: Autoria própria.

É interessante notar que, nos três sistemas, a absorção aumenta até aproximadamente 24 h, porém com uma taxa muito menor que as 3 horas iniciais. Com relação à quantidade de fármaco encapsulado, observa-se que a quitosana com alta massa molar (CS_{mod}) e a quitosana quaternizada (CS_{quat}) apresentaram desempenhos semelhantes. O fato da quitosana quaternizada ter carga faz com que ela seja solúvel em pH neutro e tenha baixa solubilidade em pH ácido o que pode favorecer a liberação controlada em pH neutro.

Após verificar o comportamento das três amostras de quitosana, decidimos selecionar a quitosana quaternizada (CS_{quat}) e a de alta massa molar (CS_{mod}) para otimizar os estudos. Foram testadas 4 amostras contendo quitosana e TPP na proporção 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1. Os testes realizados por 24 horas mostraram que a quitosana quaternizada (Figura 44) apresentou um perfil de liberação intensa nas 6 horas iniciais e um crescimento menos intenso após 24 horas. As amostras que contem quantidade de CS_{quat} e TPP na proporção 1:1 e 2:1 apresentaram resultados melhores, com porcentagem de liberação cumulativa maior, sendo que a amostra 2:1 chegou a uma porcentagem de 15%.

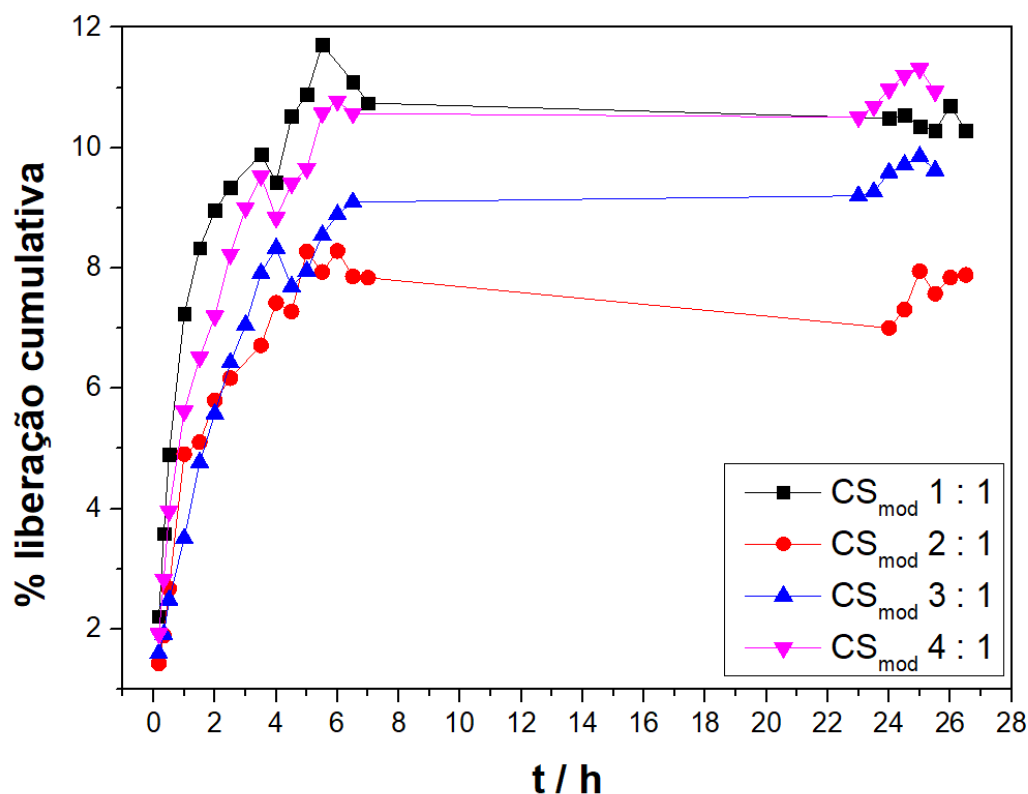
Figura 44 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado com quitosana quaternizada (CS_{quat}), todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento de onda fixo em 271 nm.



Fonte: Autoria própria.

A quitosana de alta massa molar (Figura 45) apresentou um perfil semelhante ao da quitosana quaternizada, contudo a quantidade de liberação cumulativa foi menor. As amostras 1:1 e 4:1 de CS_{mod} e TPP tiveram perfis muito semelhantes, com porcentagem de liberação cumulativa alcançando 11%.

Figura 45 - Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado com quitosana de alta massa molar (CS_{mod}), todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a 0,5 mL min⁻¹. Comprimento de onda fixo em 271 nm.



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 9 mostra as quantidades encapsuladas de HCTZ para as amostras das Figuras 44 e 45. Nas duas quitosanas usadas, as amostras que contém 1:1 e 2:1 apresentaram maiores quantidades encapsuladas, em torno de 40% e 20%, respectivamente.

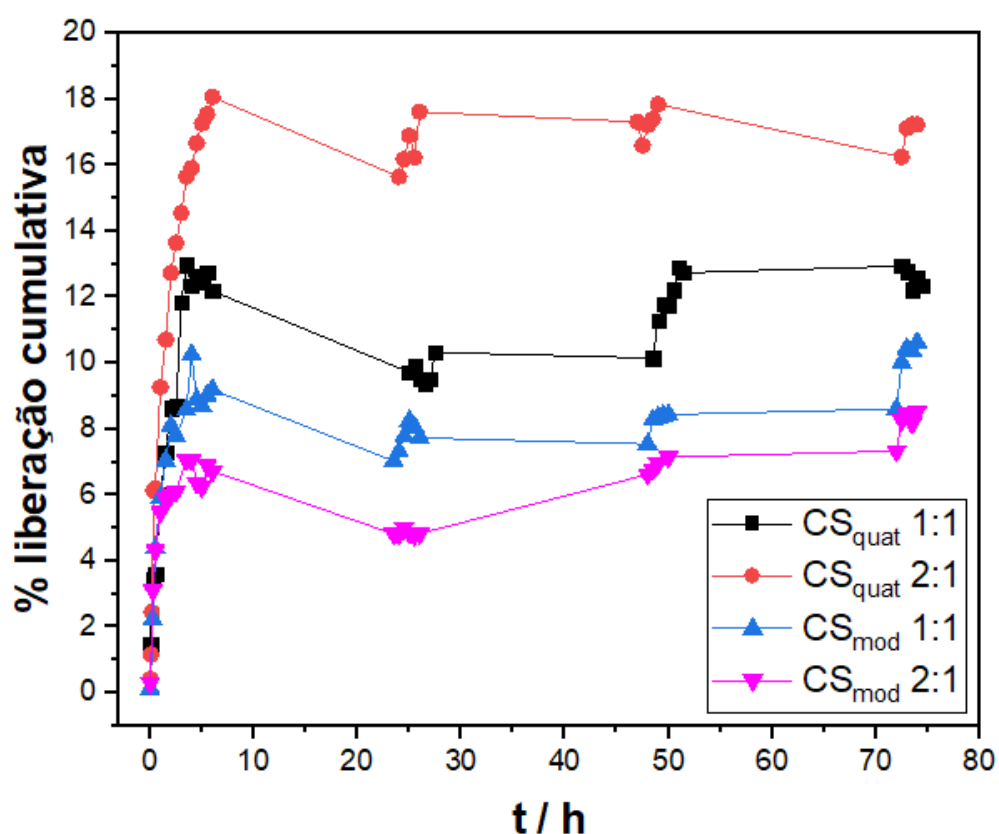
Tabela 9- Cálculo da quantidade encapsulada de HCTZ.

		[HCTZ] _{inicial}	[HCTZ] _{centrifugada}	% Encapsulada
CS_{mod} / TPP	1:1	$1,51 \times 10^{-3}$	$8,74 \times 10^{-4}$	42
	2:1	$1,01 \times 10^{-3}$	$8,02 \times 10^{-4}$	21
	3:1	$7,56 \times 10^{-4}$	$6,20 \times 10^{-4}$	18
	4:1	$6,22 \times 10^{-4}$	$5,35 \times 10^{-4}$	14
CS_{quat} / TPP	1:1	$1,51 \times 10^{-3}$	$8,85 \times 10^{-4}$	41
	2:1	$1,01 \times 10^{-3}$	$7,88 \times 10^{-4}$	22
	3:1	$7,56 \times 10^{-4}$	$6,04 \times 10^{-4}$	20
	4:1	$6,22 \times 10^{-4}$	$5,09 \times 10^{-4}$	18

Fonte: Autoria própria.

Na literatura encontramos valores baixos de encapsulamento, KARIMINIA (*et al.*, 2016) utilizou quitosana, Fe_3O_4 e ciprofloxacina, encontrou porcentagens de encapsulamento que variaram de 4,6 a 9%. Em outro trabalho ARANAZ (*et al.*, 2016) utilizando um sistema que contém quitosana, nanopartículas de prata, cloridrato de ciprofloxacina e TPP obteve porcentagens de encapsulamento de 9 a 32%.

Figura 46 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado para CS_{quat} e CS_{mod} , todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento de onda fixo em 271 nm.



Fonte: Autoria própria.

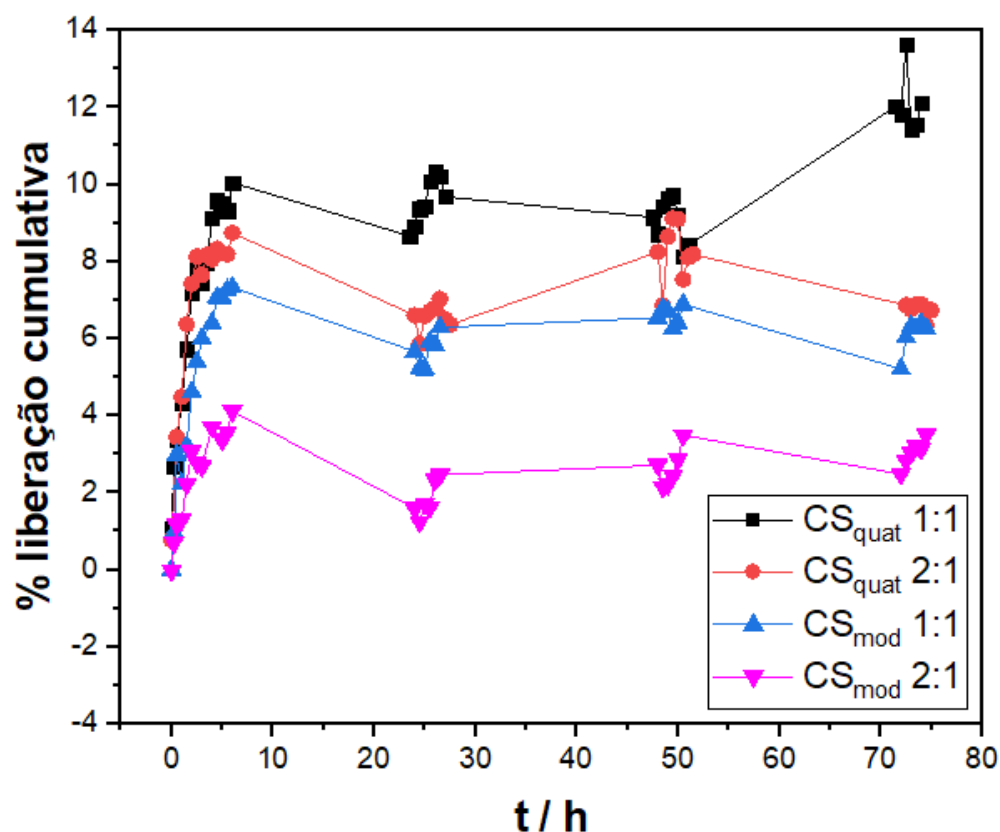
Analisando os resultados obtidos nas Figuras 44 e 45, combinados com os resultados de encapsulamento mostrados na Tabela 9, escolhemos as amostras que contém a quantidade de 1:1 e 2:1 de quitosana e TPP, para avaliar a liberação em pH 2 e analisar a liberação por DPV. Pois ambas amostras apresentaram resultados melhores para a quitosana quaternizada, que conforme dissemos anteriormente, por ser solúvel em pH7 e ter baixa solubilidade em pH 2 pode ser o

sistema mais promissor para esta liberação, além disso foram as amostras que encapsularam quantidades maiores.

Primeiramente, repetimos os resultados obtidos para pH 7 todavia aumentando o tempo de liberação para 75 h, a fim de constatar se ocorre aumento da liberação após as 24 h analisadas anteriormente. Os resultados obtidos para a liberação até 75 h para pH 7 (Figura 46) mostraram que a porcentagem de liberação após as 24 h não se altera muito, permanecendo muito próxima ao valor obtido para 6h liberação. Além disso, a CS_{quat} 2:1 alcançou resultados melhores chegando a 18% de liberação cumulativa, enquanto as outras amostras ficaram entre 7% e 9%.

Os mesmos procedimentos foram realizados para a liberação em pH 2 conforme podemos verificar na Figura 47.

Figura 47 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado para CS_{quat} e CS_{mod} , todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento de onda fixo em 271 nm.



Fonte: Autoria própria.

Observando os resultados obtidos para pH 7 (Figura 46) e pH 2 (Figura 47) podemos constatar que ambas quitosanas apresentaram melhores resultados de liberação em pH 7 do que em pH 2. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos das liberações cumulativas para as amostras das Figuras 46 e 47.

Tabela 10- Porcentagem de liberação cumulativa nas amostras de CS_{quat} e CS_{mod} para 50h de liberação em pH 7 e pH 2, comparadas com a quantidade encapsulada em cada amostra.

Amostras		% liberada em pH 7	% liberada em pH 2
CS _{quat} / TPP	1: 1	13	10
	2:1	18	9
CS _{mod} / TPP	1:1	9	7
	2:1	7	4

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados obtidos nas liberações em pH 7 e pH 2 mostrados na Tabela 10, podemos dizer que o melhor resultado foi para as amostras cuja proporção de quitosana e TPP era 2:1 e que a amostra que contém CS_{quat} apresentou o resultado mais significativo. A quantidade liberada em pH 7 foi 18%, enquanto que em pH 2 foi 9% metade do valor obtido em pH 7, mostrando que a quitosana quaternizada conseguiu reter melhor o HCTZ em pH ácido.

Com relação aos valores obtidos de liberação cumulativa serem baixos, podemos verificar que mesmo após 75 horas de testes de liberação, ainda encontramos um pouco de amostra no interior dos saquinhos de diálise. Além disso, muito material se perdeu no frasco de síntese, fazendo com que a quantidade que foi efetivamente liberada fosse menor do que a quantidade sintetizada.

Tabela 11- Comparação das porcentagens de liberação cumulativa de sistemas de liberação de fármacos.

Sistema	Fármaco liberado	Liberação cumulativa (%)	Tempo (h)	Referência
HACC/TPP	probucool aspirina	60 40	100	LIU, HE, 2015
membranas de quitosana/glicerol	cloridrato de tetraciclina (TH) sulfadiazina de prata (AgSD)	20, 60 e 80 30, 50 e 60	30	MA <i>et al.</i> , 2017
hidrogel de pectina-quitosana	ácido 5-aminossalicílico curcumina progesterona	14 8 100	24	NEUFELD, BIANCO-PELED, 2017
nanopartículas de lecitina/quitosna	HCTZ- β -CD-3 HCTZ-3 HCTZ	70 67 45	24	CHADHA <i>et al.</i> , 2012
(CS _{quat} /TPP 2:1)	hidroclorotiazida (HCTZ)	pH 7: 18 pH 2: 9	50	Este trabalho

HACC: quitosana modificada com sal de amônio quaternário

HCTZ- β -CD-3: hidroclorotiazida complexada com β -ciclodextrina

HCTZ-3: nanopartículas de lecitina / quitosana carregados com HCTZ

A Tabela 11 mostra diversos sistemas de liberação controlada contendo quitosana em sua composição, podemos verificar que a porcentagem de liberação cumulativa está associada diretamente a composição do sistema e também ao fármaco carregado. Por exemplo, para o sistema de hidrogel de pectina-quitosana, a liberação do ácido 5-aminossalicílico atingiu 14%, curcumina 8% e progesterona 100% em 24 horas de liberação (NEUFELD, BIANCO-PELED, 2017). Com isso, é bem provável que se tivéssemos utilizado outro fármaco, mais solúvel do que a hidroclorotiazida, provavelmente teríamos resultados mais significativos de liberação controlada.

4.6.3 Detecção da liberação por DPV

Diversos testes foram realizados com o eletrodo de carbono vítreo com o intuito de realizar a detecção da HCTZ via método eletroquímico, porém alguns problemas foram encontrados ao longo destes estudos.

A modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de parede múltiplas e nanopartículas de ouro (GC/MWCNTsf/Au) mostrou

ótimos resultados de quantificação da HCTZ presente em urina sintética (pH 6), conforme podemos visualizar no artigo que publicamos (GALHARDO *et al.*, 2020). Em nosso trabalho, encontramos o limite de detecção de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e o limite de quantificação de $3,3 \text{ mg L}^{-1}$, sendo que a quantidade encontrada na urina após o primeiro dia de consumo do medicamento deve ser maior que 14 mg L^{-1} . A partir dos dados encontrados, testamos a utilização desse eletrodo modificado na detecção da HCTZ para o sistema de liberação controlada cujos dados estão neste documento.

Contudo, ao realizar os testes com o eletrodo GC/MWCNTsf/Au para a detecção por diversas horas da liberação controlada, verificamos diversos problemas:

1º) a concentração detectada, em torno de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (que corresponde a aproximadamente $29,8 \text{ mg L}^{-1}$), é alta quando estamos falando em detecção eletroquímica, o que faz com que após a primeira medida o eletrodo fique com a HCTZ adsorvida dificultando a detecção do próximo ponto. Mesmo realizando a limpeza eletroquímica com o tampão o resultado não era reprodutível. Em nosso trabalho com a urina sintética conseguimos realizar a detecção de 3 amostras contendo 14 mg L^{-1} , 23 mg L^{-1} ou 39 mg L^{-1} de HCTZ (GALHARDO *et al.*, 2020), porém essas medidas não eram realizadas por tempo prolongado, como é o caso no sistema de liberação controlada;

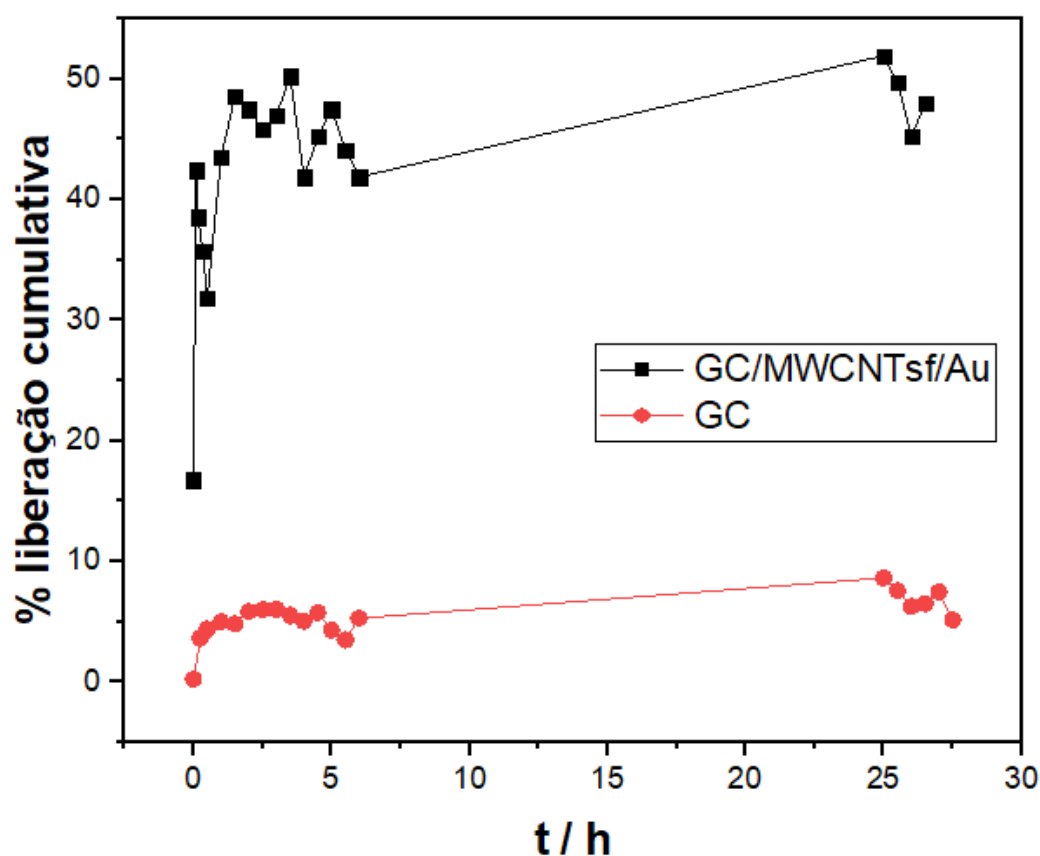
2º) após diversas medidas com o mesmo eletrodo modificado, o depósito ia se soltando, fazendo com que a superfície modificada se alterasse, prejudicando os resultados;

3º) tornasse inviável ter que modificar vários eletrodos de carbono vítreo para realizar as medidas a cada 30 min, para 6 h de detecção precisaríamos de pelo menos 12 eletrodos. Além disso, o material MWCNTsf/Au precisa de pelo menos 12 horas no dessecador para secar bem e evitar que se desprenda do eletrodo.

Com todos os problemas encontrados durante a fase final de testes de liberação controlada, decidimos utilizar o eletrodo de carbono vítreo limpo, sem a modificação da superfície para realizar essa parte do estudo. Com intuito de diminuir o problema de desprendimento do material do eletrodo, bem como a questão da modificação da área superficial. Os dados de caracterização dos eletrodos limpos e modificados mostrados na secção 4.1.2 evidenciam que a

modificação da superfície melhora os limites de quantificação e detecção, mas que o eletrodo limpo com base apresenta também bons resultados. As curvas analíticas em pH 2 e pH 7 são mostradas nas Figuras 30 e 31, respectivamente.

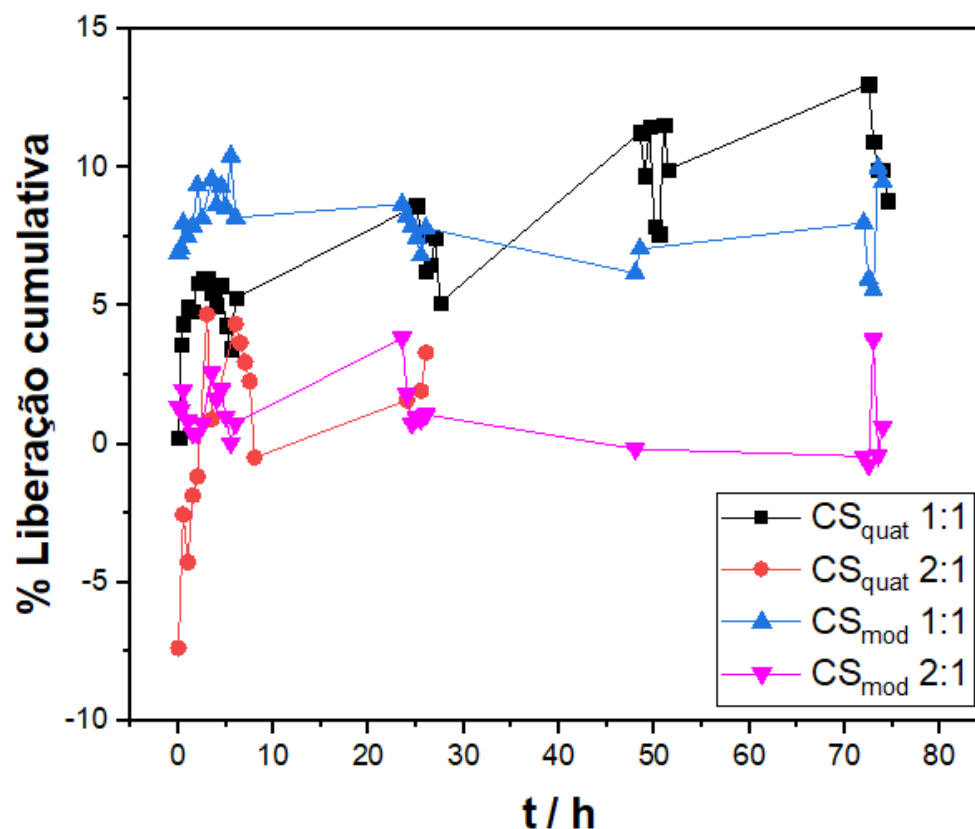
Figura 48 - Gráfico comparando as detecções por DPV em eletrodo modificado (GC/MWCNTsf/Au) e eletrodo limpo (GC). Liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, amostra contendo 1:1 de CS_{quat} / TPP.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 48 mostra a comparação da liberação controlada acompanhada por DPV utilizando o eletrodo modificado GC/MWCNTsf/Au e o eletrodo limpo GC. Vemos que para a mesma amostra 1:1 de CS_{quat} / TPP, os resultados obtidos são muito discrepantes. Além disso, não se assemelham aos resultados obtidos por UV-vis conforme demonstrado na Figura 46.

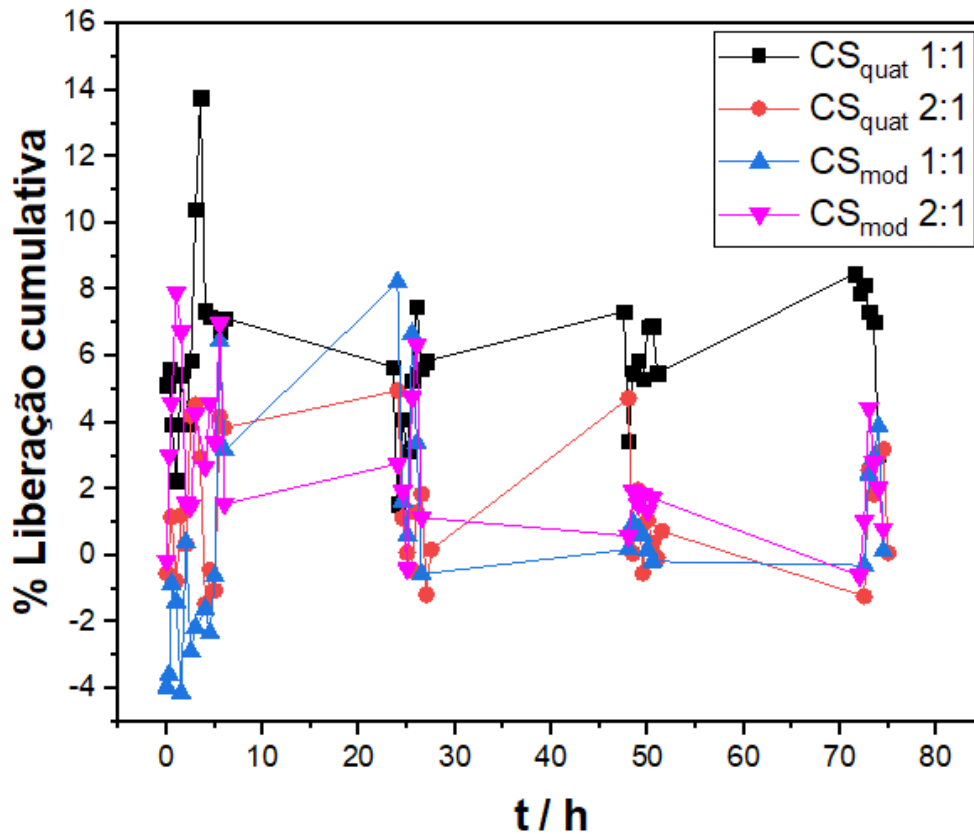
Figura 49 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 7, encapsulamento realizado para CS_{quat} e CS_{mod} , todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção por DPV usando GC sem modificação.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 49 mostra os resultados obtidos por DPV para as amostras cuja liberação ocorreram em pH 7, constatamos que mesmo realizando a limpeza eletroquímica antes de cada medida, os valores obtidos não são condizentes com os obtidos para as detecções por UV-vis mostrados na Figura 46.

Figura 50 - Comparação da liberação da HCTZ em tampão Britton-Robinson pH 2, encapsulamento realizado para CS_{quat} e CS_{mod} , todas com 5 mL de TPP. Gotejamento do TPP a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção por DPV usando GC sem modificação.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos por DPV em pH 2, Figura 50, também estão bem diferente dos determinados por UV-vis, Figura 47. Nossas análises mostraram que praticamente não ocorreu variação da corrente medida para diversos tempos de detecção, o que não é demonstrado nas amostras medidas por UV-vis. Inclusive, o gráfico de liberação mostra resultados negativos de porcentagem de liberação cumulativa, o que não é verdade, pois foi demonstrado anteriormente, que todas as amostras continham HCTZ em sua composição, sendo portanto, impossível obter resultado negativo de liberação.

5 CONCLUSÃO

Os estudos mostraram que a quitosana quaternizada gerou resultados mais adequados para o sistema de liberação controlada do fármaco hidroclorotiazida (HCTZ) na detecção por UV-vis. A amostra que contém 2:1 de CS_{quat} / TPP foi a que apresentou melhor resultado, sendo que foi encapsulada 22% da quantidade inicialmente acrescentada e foram liberados 18% em pH 7 e 9% em pH 2. Ou seja, a quitosana quaternizada conseguiu reter metade da quantidade liberada em pH 7.

Foi obtida a caracterização da superfície do eletrodo de carbono vítreo modificada com nanotubos de carbono de parede múltiplas e nanopartículas de ouro (GC/MWCNTsf/Au), porém na detecção por DPV os testes de liberação controlada apresentaram resultados muito diferentes dos obtidos para UV-vis, mostrando que para este sistema seria melhor utilizar vários eletrodos modificados para realizar cada detecção, pois as amostras são acompanhadas por vários dias. Com isso seria interessante realizar estudos com eletrodos descartáveis para a detecção da liberação controlada, já que esses eletrodos são usados uma vez e não teria o problema de adsorver a molécula na superfície do eletrodo, impossibilitando novas análises.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOYE, O.; CABRAL-MARQUES, H. Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: a mini review. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 531, p. 521–531, 2017.

AFKHAMI, A.; BAHIRAEI, A.; MADRAKIAN, T. Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 59, p. 168-176, 2016.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.100, n. 1, p. 5-28, 2004.

AHSAN, S. M.; THOMAS, M.; REDDY, K. K.; SOORAPARAJU, S. G.; ASTHANA, A.; BHATNAGA, I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 110, p. 97–109, 2018.

AIBA, S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 40-44, 1991.

ALGHAMDI, A. F. Electrochemical oxidation behavior of hydrochlorothiazide on a glassy carbon electrode and its voltammetric determination in pharmaceutical formulations and biological fluids. **Journal of Food and Drug Analysis**, Berkeley, v. 22, p. 363-369, 2014.

ALI, A.; AHMEDB, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 109, p. 273–286, 2018.

AN, N. T.; THIEN, D. T.; DONG, N. T.; DUNG, P. L. Water-soluble N-carboxymethylchitosan derivatives: preparation, characteristics and its application, **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 75, p. 489–497, 2009.

ANJO, D. M.; KAHR, M.; KHODABAKHSH, M.; NOWINSKI, S.; WANGER, M. Electrochemical activation of carbon electrodes in base: minimization of dopamine adsorption and electrode capacitance. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 61, p. 2603-2608, 1989.

ARANAZ, J.; HARRIS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; HERAS, A.; COSTA, N. Chitosan based films as support for dual antimicrobial release. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 146, p. 402-410, 2016.

BAHRAMI, B.; HOJJAT-FARSANGI, M.; MOHAMMADI, H.; ANVARI, E.; GHALAMFARSA, G.; YOUSEFI, M.; JADIDI-NIARAGHE, F. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 190, p. 64–83, 2017.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods**: fundamentals and applications. 2. ed. New York: John Wiley, 2001. 850p.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007

BATLOUNI, M. Diuréticos. **Revista Brasileira de Hipertensão**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 211-214, 2009.

BEITOLLAHI, H.; HAMZAVI, M.; TORKZADEH-MAHANI, M. Electrochemical determination of hydrochlorothiazide and folic acid in real samples using a modified graphene oxide sheet paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 52, p. 297–305, 2015.

BOZAL, B.; GUMUSTAS, M.; DOGAN-TOPAL, B.; USLU, B.; OZKAN, S. A. Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. **Journal of AOAC International**, Cary, v. 96, n. 1, p. 42-51, 2013.

BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S. P.; ASSIS, O. B. G. Mechanical properties of N,N,N-trimethylchitosan chloride films. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Carlos, v. 15, n. 2, p. 142-145, 2005.

BUGNICOURT, L.; ALCOUFFE, P.; LADAVIÈRE, C. Elaboration of chitosan nanoparticles: favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical and colloidally stable objects. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 457, p. 476-486, 2014.

CAETANO, F. R.; FELIPPE, L. B.; ZARBIN, A. J. G.; BERGAMINI, M. F. MARCOLINO-FILHO, L. H., Gold nanoparticles supported on multi-walled carbon nanotubes produced by biphasic modified method and dopamine sensing application. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 243, p. 43–50, 2017.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carries. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 63, p.125-132, 1997.

CHADHA, R.; BHANDARI, S.; KATARIA, D.; GUPTA, S.; JAIN, D. S. Exploring the potential of lecithin/chitosan nanoparticles in enhancement of antihypertensive efficacy of hydrochlorothiazide. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 29, n.8, p. 805–812, 2012.

CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M. D.; HOEMANN, C. D.; LEROUX, J. C.; ATKINSON, B. L.; BINETTE, F.; SELMANI, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 21, n. 21, p. 2155-2161, 2000.

CUDINA, O.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; RUVARAC-BUGARCIC, I.; JANKOVIC, I. Interaction of hydrochlorothiazide with cationic surfactant micelles of cetyltrimethylammonium bromide. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 256, p. 225-232, 2005.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, London, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DEKANSKI, A.; STEVANOVIC, J.; STEVANOVIC, R.; NIKOLIC, B. Z.; JOVANOVIC, V. M. Glassy carbon electrodes I. characterization and electrochemical activation. **Carbon**, Oxford, v. 39, p. 1195-1205, 2001.

DELMAR, K.; BIANCO-PELED, H. Composite chitosan hydrogels for extended release of hydrophobic drugs. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 136, p. 570-580, 2016.

DEPPELER, H. P. Hydrochlorothiazide. **Analytical Profiles of Drug Substances**. San Diego, v. 10, p. 405 – 441, 1981.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

EISELE, A. P. P.; MANSANO, G. R.; OLIVEIRA, F. M.; CASARIN, J.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in combined dosage forms: electroanalytical performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 732, p. 46–52, 2014.

FREIRE, P., **Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa**. 25. ed. São Paulo: Paz e Terra, 2002. 144 p.

GALHARDO, K. S.; DADAMOS, T. R. L.; SILVA, R. J. N. B.; MACHADO, S. A. S. Development and validation of an advanced electrochemical sensor for the fast and cheap determination of hydrochlorothiazide in urine samples using the Monte-Carlo method for uncertainty evaluation. **Talanta**, Amsterdam, v. 215, p. 1-7, 2020.

GONG, C.; QI, T.; WEI, X.; QU, Y.; WU, Q.; LUO, F.; QIAN, Z. Thermosensitive polymeric hydrogels as drug delivery systems. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 20, p. 79-94, 2013.

GRAHAM, N. B. Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs. **The British Polymer Journal**, Oxford, v. 10, p. 260-266, 1978.

HELI, H.; PISHAHANG, J.; AMIRI, H. B.; SATTARAHMADY, N. Synthesis of nickel nanowrinkles and its application for the electrocatalytic oxidation and sensitive detection of hydrochlorothiazide. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 130, p. 205–212, 2017.

HIDROCLOROTIAZIDA. Responsável técnico. Ronoel Caza de Dio. Hortolândia: EMS S/A, 2018. 1 bula de remédio.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of desacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, New York, v. 26, n. 1, p. 87-94, 1991.

HU, Q.; CHEN, Q.; GU, Z. Advances in transformable drug delivery systems. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 178, p. 546-558, 2018.

HUANG, D.; WU, D. Biodegradable dendrimers for drug delivery. **Materials Science & Engineering C**, Lausanne, v. 90, p.713–727, 2018.

HUDARI, F. F.; SOUZA, J. C.; ZANONI, M. V. B. Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Talanta**, Amsterdam, v. 179, p. 652–657, 2018.

HUO, W.; XIE, G.; ZHANG, W.; WANG, W.; SHAN, J.; LIU, H.; ZHOU, X. Preparation of a novel chitosan-microcapsules/starch blend film and the study of its drug-release mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 87, p. 114–122, 2016.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 15, n. 9, p. 1326-1331, 1998.

KADAM, Y.; YERRAMILI, U.; BAHADUR, A.; BAHADUR, P. Micelles from PEO–PPO–PEO block copolymers as nanocontainers for solubilization of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 83 p. 49–57, 2011.

KAMARAJ, S.; PALANISAMY, U. M.; MOHAMED, M. S. B. K.; GANGASALAM, A.; MARIA, G. A.; KANDASAMY, R. Curcumin drug delivery by vanillin-chitosan coated with calcium ferrite hybrid nanoparticles as carrier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 116, p. 48–60, 2018.

KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; ENSAFI, H. R. Ferrocenedicarboxylic acid modified carbon paste electrode: a sensor for electrocatalytic determination of hydrochlorothiazide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 880-887, 2009.

KARIMI-MALEH, H.; GANJALI, M. R.; NOROUZI, P.; BANANEZHAD, A. Amplified nanostructure electrochemical sensor for simultaneous determination of captopril, acetaminophen, tyrosine and hydrochlorothiazide. **Materials Science & Engineering C**, Lausanne, v. 73, p. 472–477, 2017.

KARIMINIA, S.; SHAMSIPUR, A.; SHAMSIPUR, M. Analytical characteristics and application of novel chitosan coated magnetic nanoparticles as an efficient drug delivery system for ciprofloxacin: enhanced drug release kinetics by low- frequency ultrasounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 129, p. 450-457, 2016.

KNAUL, J. Z.; KASAAI, M. R.; BUI, V. T.; CREBER, K. A. M. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. **Canadian Journal Chemistry**, Ottawa, v. 76, p. 1699–1706, 1998.

KOUKARAS, E. N.; PAPADIMITRIOU, S. A.; BIKIARIS, D. N.; FROUDAKIS, G. E. Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 9, n. 10, p. 2856-2862, 2012.

KUBOTA, N.; TATSUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 324, n. 4, p. 268-274, 2000.

KUMAR, B.; JALODIA, K.; KUMAR, P.; GAUTAM, H. K. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, p. 260-268, 2017.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LIU, H.; HE, J. Simultaneous release of hydrophilic and hydrophobic drugs from modified chitosan nanoparticles. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 161, p. 415–418, 2015.

LUCERO, M. J.; FERRIS, C.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, C. A.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M. R.; de PAZ, M., -V. Novel aqueous chitosan-based dispersions as efficient drug delivery systems for topical use. rheological, textural and release studies. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 151, p. 692-699, 2016.

MA, Y.; XIN, L.; TAN, H.; FAN, M.; LI, J.; JIA, Y.; LING, Z.; CHEN, Y.; HU, X. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Materials Science & Engineering C**, Lausanne, v. 81, p. 522–531, 2017.

MACHINI, W. B. S.; DAVID-PARRA, D. N.; TEIXEIRA, M. F. S. Electrochemical investigation of the voltammetric determination of hydrochlorothiazide using a nickel hydroxide modified nickel electrode. **Materials Science & Engineering C**, Lausanne, v. 57, p. 344-348, 2015.

- MALUTA, J. R.; CANEVARI, T. C.; MACHADO, S. A. S. Sensitive determination of nitric oxide using an electrochemical sensor based on MWCNTs decorated with spherical Au nanoparticles. **Journal of Solid State Electrochemistry**, Heidelberg, v. 18, p. 2497-2504, 2014.
- MARASINI, N.; HAQUE, S.; KAMINSKAS, L. M. Polymer-drug conjugates as inhalable drug delivery systems: a review. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v. 31, p. 18-29, 2017.
- MARTIN, M. N.; BASHAM, J. J.; CHANDO, P.; EAH, S.K. Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10 min synthesis and 2D self-assembly. **Langmuir**, Washington, v. 26, n. 10, p. 7410-7417, 2010.
- MATTIOLI-BELMONTE, M.; COMETA, S.; FERRETTI, C.; IATTA, R.; TRAPANI, A.; CECI, E.; FALCONI, M.; DE GIGLIO, E. Characterization and cytocompatibility of an antibiotic/chitosan/cyclodextrins nanocoating on titanium implants. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 110, p.173–182, 2014.
- MAZANCOVÁ, P.; NÉMETHOVÁ, V.; TRELOVÁ, D.; KLESCÍKOVÁ, L.; LACÍK, I.; RÁZGA, F. Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 192, p. 104–110, 2018.
- MENDES, C.; BUTTCHEVITZ, A.; KRUGER, J. H.; KRATZ, J. M.; SIMÕES, C. M. O.; BENEDET, P. O.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, M. A. S. Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and β -cyclodextrin: physicochemical characteristics, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 83, p. 71–78, 2016.
- MONGAY, C.; CERDA, V. A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. **Annali di Chimica**, Weinheim, v. 64, p. 409-412, 1974.
- MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; BEEZER, A. E.; MITCHELL, J. C. Sistemas transportadores de drogas. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 470-476, 1998.
- MORAES, J. T.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; SVORC, L.; SARTORI, E. R. Advanced sensing performance towards simultaneous determination of quaternary mixture of antihypertensives using boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 134, p. 173–180, 2017.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 385, p. 113–142, 2010.

- MOTOC, S.; REMES, A.; POP, A.; MANEA, F.; SCHOONMAN, J. Electrochemical detection and degradation of ibuprofen from water on multi-walled carbon nanotubes-epoxy composite electrode. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 25, n. 4, p. 838–847, 2013.
- MURATA, J. -I.; OHYA, Y.; OUCHI, T. Possibility of application of quaternary chitosan having pendant galactose residues as gene delivery tool. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 69-74, 1996.
- MUZZARELLI, R. A. A.; TANFANI, F.; EMANUELLI, M.; MARIOTTI, S. N-(carboxymethylidene)chitosans and N-(carboxymethyl)chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 107, n. 2, p.199-214, 1982.
- NAGAOKA, T.; FUKUNAGA, T.; YOSHINO, T.; WATANABE, I.; NAKAYAMA, T.; OKAZAKI, S. Uptake of ions into electrochemically treated glassy carbon. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, p. 2766-2769, 1988.
- NEUFELD, L.; BIANCO-PELED, H. Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 101, p. 852–861, 2017.
- NYGAARD, J. N.; STRAND, S. P.; VARUM, K. I.; NORDARD, C. Chitosan: gels and interfacial properties. **Polymers**, Basel, v. 7, p. 552-579, 2015.
- O'NEIL, M. J. (ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. p. 885.
- PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.
- PARMAR, A.; CHAVDA, S.; BAHADUR, P. Pluronic-cationic surfactant mixed micelles: solubilization and release of the drug hydrochlorothiazide. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 441, p. 389-397, 2014.
- RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; BELLICH, B.; CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 455, p. 219–228, 2013.
- RAZAK, O. A. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 34, p. 433–440, 2004.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 15, p. 281–285, 1993.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Solubilization of chitosan in strong acid medium. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, Abingdon, v. 5, n. 3, p. 267-276, 1999.

RUSSO, E.; GAGLIANONE, N.; BADALSSARI, S.; PARODI, B.; CROCE, I.; BASSI, A. M.; VERNAZZA, S.; CAVIGLIOLI, G. Chitosan-clodronate nanoparticles loaded in poloxamer gel for intra-articular administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 143, p. 88–96, 2016.

SANTOS, J. E.; SOARES, J.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, D. M.; BUKZEM, A. L.; CAMPANA-FILHO, S. P. Response surface methodology applied to the study of the microwave-assisted synthesis of quaternized chitosan. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 138, p. 317-326, 2016.

SASHIWA, H.; SHIGEMASA, Y. Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 127-138, 1999.

SIEVAL, A. B.; THANOU, M.; KOTZÉ, A. F.; VERHOEF, J. C.; BRUSSEE, J.; JUNGINGER, H. E. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 36, n. 2–3, p. 157-165, 1998.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Carlos, v.11, n. 2, p.58-64, 2001.

SILVA, L. P.; LOURENCAO, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica simultânea de besilato de amlodipina e hidroclorotiazida em amostras de urina sintética utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 801-806, 2015.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7 ed. São Paulo: Artmed, 2017. 933 p.

SIPOLI, C. C.; SANTANA, N.; SHIMOJO, A. A. M.; AZZONI, A.; TORRE, L. G. Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the *in vitro* transfection efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 94, p. 65–73, 2015.

SOARES, P. I.; SOUZA, A. I.; SILVA, J. C.; FERREIRA, I. M. M.; NOVO, C. M. M.; BORGES, J. P. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 147, p. 304-312, 2016.

SORLIER, P.; DENUZIÈRE, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, Washington, v. 2, n. 3, p. 765-772, 2001.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SUGIMOTO, M.; MORIMOTO, M.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y. Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 49-59, 1998.

SULTAN, A. A.; EL-GIZAWY, S. A.; OSMAN, M. A.; EL MAGHRABY, G. M. Self dispersing mixed micelles forming systems for enhanced dissolution and intestinal permeability of hydrochlorothiazide. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 149, p. 206–216, 2017.

UNITED STATES. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 3639, Hydrochlorothiazide**. Bethesda, [20--]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrochlorothiazide>. Acesso em: 02 ago. 2019.

VALLADAO, D. M. S.; DE OLIVEIRA, L. C. S.; ZUANON NETTO, J.; IONASHIRO, M. Thermal decomposition of some diuretic agents. **Journal of Thermal Analysis**, Dordrecht, v. 46, p. 1291-1299, 1996.

WANG, J.; HUTCHINS, L. D. Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 167, p. 325-334, 1985.

YADAV, P. S.; YADAV, E.; VERMA, A.; AMIM, S. Development, characterization, and pharmacodynamic evaluation of hydrochlorothiazide loaded self-nanoemulsifying drug delivery systems. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2014, Article ID 274823, 10 p., 2014.

YANG, T.-C.; CHOU, C.-C.; LI, C.-F. Preparation, water solubility and rheological property of the N-alkylated mono or disaccharide chitosan derivatives. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n. 8, p. 707-713, 2002.