

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus Araraquara

RAFAEL LUIZ BIANCHI

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO
DE FÁRMACOS EM MATERIAIS HÍBRIDOS
UREASIL-POLIÉTER.**

Araraquara

2014

RAFAEL LUIZ BIANCHI

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO
DE FÁRMACOS EM MATERIAIS HÍBRIDOS
UREASIL-POLIÉTER.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof.^a Dr^a. Leila Aparecida Chiavacci

Co-orientador: Dr. Leandro Lopes

Araraquara

2014

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família, pelo apoio desde a escolha do curso, após momentos complicados, até a sua conclusão.

A todas as amizades que foram criadas durante esses cinco anos de faculdade, que com certeza me proporcionaram momentos inesquecíveis durante essa jornada. Agradeço em especial: Luis Fernando Salina, Diego Machado, Aline Bergo, Mariana Zaghete, Naiara Fachinetti, José Fernando Alvarenga, Juliane Vicentino, Bárbara Kapp, Vanessa Loria, Monique Gonçalves, Alice Haddad, Guilherme Caldeira, Diego Tonhoque.

A todos do Laboratório de Ciência dos Materiais Aplicados a Farmácia (CMAF), pelas amizades e por tudo que colaboraram no decorrer do projeto, alguns em especial: Juliana Fernandes e João Oshiro.

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Leila Aparecida Chiavacci, pela oportunidade, paciência e apoio no desenvolvimento desse projeto.

Sumário

Resumo.....	5
Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Polímeros.....	9
1.1.1 Polímeros nanoestruturados híbridos orgânico-inorgânicos.....	10
1.2 Utilização de Materiais Híbridos Orgânico-Inorgânicos na Liberação Controlada de Fármacos.....	13
1.3 Fármacos.....	17
1.3.1 Cloridrato de Pramoxina.....	17
1.3.2 Acetato de Dexametasona.....	18
2. MATERIAIS.....	20
2.1 Matérias-primas.....	20
2.2 Equipamentos.....	20
3. OBJETIVO.....	22
4. DESENVOLVIMENTO.....	22
4.1 Preparação dos híbridos orgânicos inorgânicos.....	22
4.2 Incorporação de fármaco a matriz híbrida.....	26
4.3 Avaliação do perfil de liberação do fármaco.....	27
4.4 Curva analítica.....	27
4.4.1 Acetato de Dexametasona.....	28
4.4.2 Cloridrato de Pramoxina.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29

5.1	Incorporação de fármaco a matriz híbrida.....	29
5.2	Curva analítica.....	31
5.2.1	Acetato de Dexametasona	31
5.2.2	Cloridrato de Pramoxina.....	32
5.3	Teste de liberação do acetato de dexametasona.....	33
5.4	Teste de liberação do cloridrato de pramoxina.....	34
6.	CONCLUSÕES.....	37
7.	REFERÊNCIAS.....	38

RESUMO

Sistemas de liberação controlada são formas farmacêuticas que visam aumentar a eficácia terapêutica, a segurança do tratamento e a adesão dos pacientes. Neste contexto, as matrizes poliméricas, que buscam controlar o perfil de liberação de um fármaco, surgem como opção. Assim surge a necessidade de desenvolver e analisar materiais multifuncionais, que apresentem características superiores a dos materiais poliméricos comuns, como os híbridos orgânico-inorgânicos.

Esse projeto teve como objetivo analisar a capacidade de incorporação e liberação “in vitro” dos fármacos cloridrato de pramoxina e acetato de dexametasona em sistemas híbridos orgânico-inorgânicos. As amostras foram preparadas utilizando misturas em diferentes proporções de materiais híbridos ureasil-polioxietileno (POE-1900) que possui um caráter altamente hidrofílico e ureasil-polioxipropileno (POP-400) com caráter altamente hidrofóbico. A partir dessas misturas pode-se controlar o balanço hidrofílico/hidrofóbico das matrizes híbridas, permitindo avaliar o comportamento desses sistemas, frente a incorporação de fármacos tanto hidrofílicos, como hidrofóbicos.

Os testes de incorporação revelaram a capacidade desses materiais de incorporar os fármacos cloridrato de pramoxina e acetato de dexametasona em concentrações relativamente altas (20% m/m e 3% m/m, respectivamente) se comparado a formulações hoje presentes no mercado. Utilizando as diferentes proporções dos precursores POE-1900 e POP-400 foi possível modular o perfil de liberação dos fármacos, sendo que as amostras com maiores proporções do POP-400 tiveram uma liberação mais retardada, devido hidrofobicidade do material. As amostras contendo a dexametasona (hidrofóbico) apresentaram uma liberação mais lenta, constante e gradual se comparado a pramoxina (hidrofílico).

Lista de figuras

Figura 1. Representação de classes de materiais híbridos.....	11
Figura 2. Esquema estrutural proposto para um composto híbrido.....	13
Figura 3. (a) Perfil de liberação para o diclofenaco de sódio a partir de uma matriz híbrida siloxano-polioxietileno e siloxano-polioxipropileno; (b) Variação do grau de intumescimento das matrizes contendo diferentes proporções siloxano-polioxietileno/siloxano-polioxipropileno.....	15
Figura 4. (a) Curvas de liberação do cloridrato de pramoxina para matrizes híbridas ureasil-POE e ureasil-POP de diferentes massas moleculares; (b) Curvas de liberação do acetato de dexametasona para matrizes híbridas ureasil-POE e ureasil-POP de diferentes massas moleculares.....	16
Figura 5. Estrutura química do cloridrato de pramoxina.....	17
Figura 6. Estrutura química do acetato de dexametasona.....	19
Figura 7. Esquema da síntese para preparação do híbrido ureasil-POE 1900g/mol e ureasil-POP 400g/mol.....	24
Figura 8. (a) Exemplo de membrana com o fármaco homogeneamente disperso na matriz híbrida; (b) Exemplo de membrana com o fármaco precipitado, não homogeneamente disperso na matriz híbrida.....	30
Figura 9. Curva analítica do acetato de dexametasona em tampão fosfato pH 7.2.....	31
Figura 10. Curva analítica do cloridrato de pramoxina em água.....	32
Figura 11. Perfil de liberação do acetato de dexametasona incorporada nas membranas híbridas Ureasil POP 400+ Ureasil-POE 1900 em diferentes proporções.....	33
Figura 12. Perfil de liberação do cloridrato de pramoxina incorporada nas membranas híbridas ureasil-POP 400 + ureasil-POE 1900 em diferentes proporções.....	34

Lista de tabelas

Tabela 1. Quantidades de reagentes utilizados na síntese das matrizes híbridas.....22

Tabela 2. Proporções utilizadas de cada precursor híbrido.....25

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de sistemas híbridos poliméricos nanoestruturados pode ser vista como uma área multidisciplinar, decorrente de seu enorme potencial em vários ramos da ciência e da tecnologia.

Um exemplo de aplicação, no âmbito biológico, é na criação de sistemas de liberação controlada de fármacos, que apresentam diversas vantagens frente a sistemas convencionais de administração de fármacos. As principais vantagens já evidenciadas desses sistemas de liberação, quando comparados com sistemas tradicionais são: liberação controlada e gradual do fármaco, o que permite manter concentrações terapêuticas do fármaco sem grandes variações, permitindo uma maior eficácia terapêutica e redução significativa da toxicidade, aumentando a segurança do tratamento; número de administrações reduzidas, o que possibilita uma adesão do paciente mais fácil ao tratamento (CHAVANPATIL et al., 2006; VENDRUSCOLO et al., 2005). Outras vantagens são a incorporação de substâncias tanto hidrofílicas como lipofílicas; natureza e composição de veículos variada (sem predomínio de mecanismos de instabilidade e degradação do fármaco); direcionamento a alvos específicos (AZEVEDO, 2002).

Devido a todas essas vantagens, tem aumentado cada vez mais o interesse em se descobrir novos sistemas de liberação controlada, com o intuito de modular o perfil de liberação de uma substância ativa. O uso desses sistemas permite manter a concentração do ativo (fármaco) dentro da faixa terapêutica, por um período prolongado, melhorando assim a sua eficácia e proporcionando uma administração mais segura fazendo com que o fármaco não atinja níveis inaceitáveis de toxicidade, reduzindo assim a probabilidade da ocorrência de efeitos colaterais. (BELTING et al., 2005; PEPPAS et al., 2006).

Existem no mercado, sistemas que permitem a liberação controlada do fármaco, como por exemplo, os sistemas transdérmicos, constituídos de adesivos, que são fixados sobre a pele, e permitem ação local ou sistêmica do fármaco. Este sistema oferece vantagens como: evita que o fármaco passe pelo metabolismo pré-sistêmico (caso seja de ação local), aumentando sua biodisponibilidade; reduz possíveis variações na concentração plasmática do fármaco; é de fácil manuseio, permitindo uma maior adesão dos pacientes; permite suspensão imediata da administração. (MARTINS, VEIGA, 2002).

1.1 Polímeros

Os polímeros são de extrema importância para a vida, visto que compõem os principais componentes do nosso organismo, como por exemplo carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos (GALAEV, MATTIASSON, 1999). São macromoléculas formadas pela repetição de suas unidades estruturais básicas, denominadas monômeros (ANDRADE, 1995), que podem ou não ser iguais.

Os polímeros podem ser divididos em três classes (ALMEIDA, MAGALHÃES, 2004):

- I. **Polímeros Naturais:** são biodegradáveis, como o colágeno, a celulose e a quitosana; amplamente utilizados como matrizes em liberação de fármacos.
- II. **Polímeros Naturais Modificados:** polímeros naturais, que sofrem modificações, como adição de grupos polares, reticulação ou modificações por enzimas, para que seja reduzido seu tempo de degradação.
- III. **Polímeros Sintéticos:** sintetizados a partir de reações químicas de polimerização, como o poli(etileno), poli(álcool vinílico), poli(ácido acrílico),

poli(acrilamidas), poli(etilenoglicol) e poliésteres (NASCIMENTO, et al, 2001).

O uso de materiais poliméricos na área médica tem crescido cada vez mais, e em diferentes campos como engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo e outros (MARTINS, VEIGA, 2002). Sistemas poliméricos de liberação controlada são amplamente utilizados e permitem além de uma liberação lenta e gradual do fármaco, também, dependendo do sistema, o direcionamento a alvos específicos do organismo.

1.1.1 Polímeros nanoestruturados híbridos orgânico-inorgânicos

Uma nova classe de polímeros sintéticos tem sido desenvolvida devido ao avanço tecnológico, que requer cada vez mais, materiais com diferentes propriedades agregadas, que os diferem dos convencionais. Dentre essa nova classe de polímeros nanoestruturados, destacam-se os materiais híbridos orgânico – inorgânico, que são formados através da combinação de compostos orgânicos e inorgânicos, em escala nanométrica, que apresentam propriedades complementares, que juntas formam um composto multifuncional e de maior desempenho.

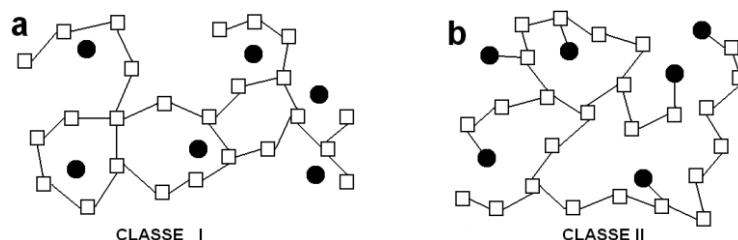
Os materiais híbridos orgânico-inorgânicos podem ser divididos em 3 classes (JOSÉ, PRADO, 2005).:

Classe I: os componentes orgânicos e inorgânicos interagem através de pontes de hidrogênio, forças de van der Waals ou ligações iônicas.

Classe II: materiais híbridos são constituídos de estruturas nas quais os componentes orgânicos e inorgânicos diretamente ligados de forma covalente ou iônico-covalente.

Classe III: Baseada na combinação dos dois tipos de interação descritos nas classes I e II.

Figura 1: Representação de classes de materiais híbridos.



Fonte: BEVENUTTI, MORO, COSTA, 2009.

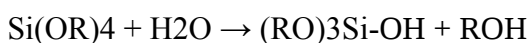
Os híbridos que possuem a sílica como componente inorgânico são um dos mais importantes, sendo amplamente estudados e aplicados tecnologicamente nos dias de hoje (BEVENUTTI, et al., 2009). Isso se deve ao fato de que os precursores alcóxidos de silício apresentam cinética lenta nas reações de gelificação (BRINKER, SCHERRER, 1990) permitindo assim um maior controle dos processos químicos envolvidos durante as reações de geleificação do material híbrido.

A maioria dos materiais híbridos presentes no mercado é sintetizada e processada a partir de uma rota de síntese química denominada sol-gel, onde um precursor organosilano é polimerizado em uma matriz de macromoléculas orgânicas (CHIANG, MA, 2002). Este processo é baseado na: a) copolimerização de organosilanos funcionais, macromônômeros e alcóxidos metálicos, b) encapsulação de componentes orgânicos em sílica ou alcóxidos metálicos, c) funcionalização de nanopartículas, argilas ou outros compostos com estruturas lamelares, etc.

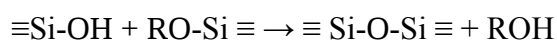
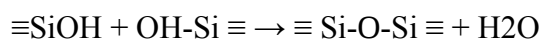
O processo sol-gel apresenta vantagens de poder ser conduzido a temperaturas relativamente baixas, sendo, portanto, adequado para a introdução de componentes orgânicos em matrizes inorgânicas, ou vice-versa. Um importante exemplo é a possibilidade de incorporação de fármacos termossensíveis nas matrizes híbridas.

As reações químicas envolvidas num processo sol-gel convencional, baseado em derivados alcóxidos, são:

1 – Hidrólise do precursor:



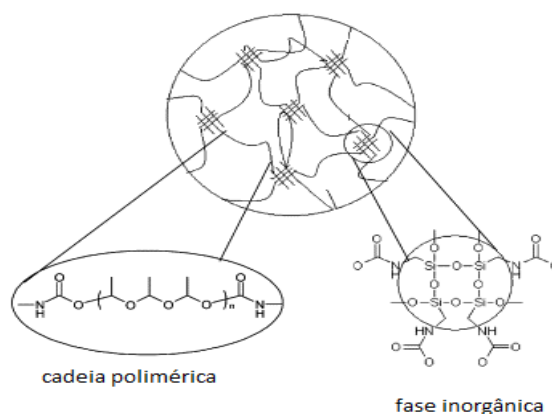
2 – A etapa posterior envolve reações de condensação:



Sendo as reações de gelificação de alcóxidos de silício bastante lentas, comumente são adicionados catalisadores. Diferentes estruturas são obtidas quando se utiliza catalisadores ácidos ou básicos (BRINKER, SCHERRER, 1990). Estes diferentes arranjos dos silicatos se refletem na distribuição dos domínios de sílica nos híbridos. Encontra-se bem estabelecido que os catalisadores ácidos produzem estruturas mais lineares e fáceis de dispersar que os catalisadores alcalinos (SCHUBERT, HÜSING, 2001).

O componente orgânico confere aos nanocompositos propriedades físicas ou químicas específicas (ópticas, elétricas, reatividade química ou bioquímica), enquanto a parte inorgânica contribui com o aumento da resistência mecânica e térmica e permite modular o índice de refração (CHIANG, MA, 2002). A fase orgânica (parte polimérica) do híbrido possui baixa densidade e fornece flexibilidade ao material, enquanto que a fase inorgânica é quebradiça, entretanto possui resistência térmica e superficial. (YANO, 1994).

Figura 2: Esquema estrutural proposto para um composto híbrido.



Fonte: REKONDO et al., 2006.

1.2 Utilização de Materiais Híbridos Orgânico-Inorgânicos na Liberação Controlada de Fármacos.

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos podem ser preparados e modificados com a grande variedade de combinações dos componentes disponíveis, conferindo diferentes contribuições nas propriedades do material resultante, possibilitando modificações nas propriedades mecânicas, controle da porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico do híbrido (ZOPPI et al., 1997), e tais modificações permitem o uso desses materiais como sistemas de liberação de fármacos.

Em recentes trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa, foi avaliada a utilização de materiais híbridos ureasil-poliéter como sistemas de liberação controlada de fármacos (SANTILLI et al., 2009). Utilizando como fármaco o diclofenaco de sódio, foram testadas duas matrizes híbridas com diferentes características de hidrofília/hidrofobia, o ureasil-

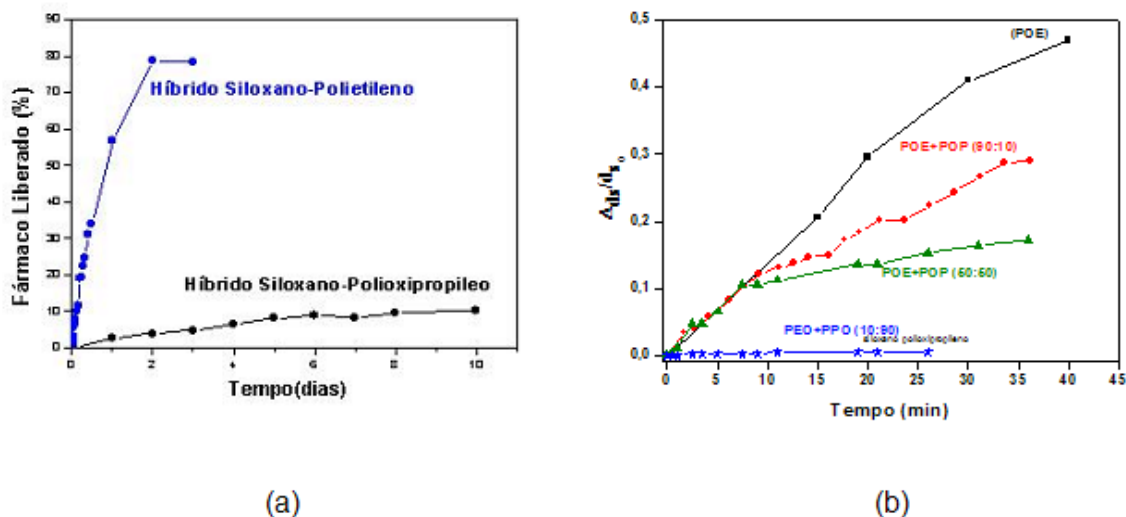
polioxietileno (hidrofílico) que proporcionou a liberação do fármaco em algumas horas, e o ureasil-polioxipropileno (hidrofóbico) que permitiu uma liberação mais prolongada do fármaco, durando alguns dias, como pode ser observado na figura 3 (a).

A diferença no balanço hidrofílico/hidrofóbico entre as cadeias poliméricas determina o grau de intumescimento da matriz, o que influencia no perfil de liberação do fármaco, pois esse balanço é o que determina o processo de transporte da água e do fármaco pela matriz, controlando a velocidade e a extensão de liberação do fármaco. Como a liberação é determinada pelo grau de intumescimento da matriz, seguido pelo transporte da água para dentro do polímero e do fármaco para fora da matriz, matrizes mais hidrofílicas, como o ureasil-polioxietileno, promovem uma liberação mais rápida do fármaco, já que sofre um intumescimento mais rápido, sendo a liberação regulada pela osmose. Contudo, isso não ocorre em matrizes com caráter mais hidrofóbico, como o ureasil-polioxipropileno, onde a liberação é mais lenta, pois é controlada pela difusão em estado sólido.

Com base nesses comportamentos, foram sintetizadas matrizes, contendo misturas em diferentes proporções de ureasil-polioxietileno (POE) e ureasil-polioxipropileno (POP), permitindo assim ter um maior controle sobre o balanço hidrofílico/hidrofóbico, com o objetivo de proporcionar uma melhor modulação sobre o perfil de liberação do fármaco. Na figura 3 (b) pode-se observar que as matrizes obtidas permitem modular o grau de intumescimento, modulando assim a liberação do diclofenaco de sódio, variando a proporção entre os polímeros.

Figura 3:

- (a) Perfil de liberação para o diclofenaco de sódio a partir de uma matriz híbrida siloxano-polioxietileno e siloxano-polioxipropileno;
- (b) Variação do grau de intumescimento das matrizes contendo diferentes proporções siloxano-polioxietileno/siloxano- polioxipropileno.



Fonte: SANTILLI et al., 2009.

Neste trabalho prévio apenas foi avaliado o perfil de liberação “*in vitro*” do diclofenaco de sódio, um fármaco com alta solubilidade em água. O diclofenaco de sódio também foi incorporado nessas matrizes híbridas, em variadas concentrações (01%, 6%, 11% e 17%). Para fármacos altamente hidrofóbicos o efeito do balanço hidrofílico/hidrofóbico da matriz polimérica sobre o perfil de liberação não é conhecido.

Recentemente o mesmo grupo de pesquisa (SANTILLI et al., 2009) têm investigado a utilização de híbridos orgânico-inorgânicos na preparação de materiais poliéter (POE ou POP) reticulados com ureasil flexíveis, transparentes, insolúveis e com taxa de liberação de fármacos controlável. Em outros trabalhos (LOPES, 2010), esses materiais híbridos orgânicos-inorgânicos à base de POE ou POP apresentaram capacidade de incorporar diversos tipos de fármacos tais como o naproxeno sódico, que apresenta baixos valores de coeficiente

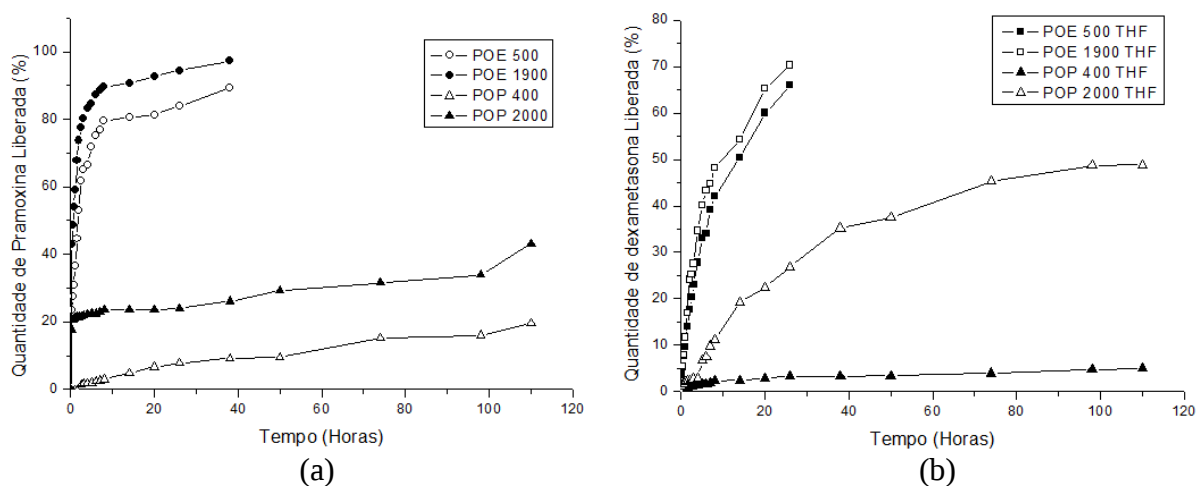
de permeabilidade; o piroxicam, que possui baixo grau de solubilidade em solução aquosa, a doxorrubicina, com ação anticancerígena e um composto natural (pristimerina).

Em recentes trabalhos do grupo de pesquisa (MENDES, 2012) foram analisados os perfis de liberação *in vitro* dos fármacos cloridrato de pramoxina e acetato de dexametasona. Entretanto, foram utilizadas apenas amostras contendo os híbridos puros. Os resultados desse estudo podem ser visualizados nas figuras 4 (a) e 4 (b).

Figura 4:

(a): Curvas de liberação do cloridrato de pramoxina para matrizes híbridas ureasil-POE e ureasil-POP de diferentes massas moleculares.

(b): Curvas de liberação do acetato de dexametasona para matrizes híbridas ureasil-POE e ureasil-POP de diferentes massas moleculares.



Fonte: MENDES, 2012.

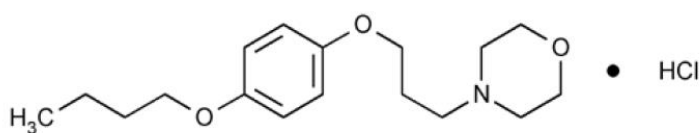
1.3 Fármacos

1.3.1 Cloridrato de Pramoxina

O cloridrato de pramoxina é um fármaco com ação anestésica local, cujo mecanismo de ação se dá pelo bloqueio da iniciação e da condução dos impulsos nervosos, devido ao fato de provocar a redução da permeabilidade aos íons sódio na membrana neuronal. Isso provoca um desaparecimento da fase de despolarização, gerando um potencial de com propagação insuficiente, bloqueando a condução.

O fármaco possui boa absorção através das mucosas, sendo a velocidade de tal processo dependente da vascularização ou da velocidade do fluxo sanguíneo no local da aplicação assim como a dose administrada. De acordo com a classificação biofarmacêutica, é um fármaco considerado de classe I, por apresentar elevada permeabilidade e solubilidade. É comumente indicado para anestesia local, supressão do refluxo da náusea, tratamento de transtornos anorretais, dor esofágica, transtornos da cavidade oral, dor da faringe e uretrite (BRUNTON et al., 2007). Sua fórmula molecular é representada pela estrutura apresentada na Figura 5.

Figura 5: Estrutura química do cloridrato de pramoxina.



Fonte: USP 32, 2010.

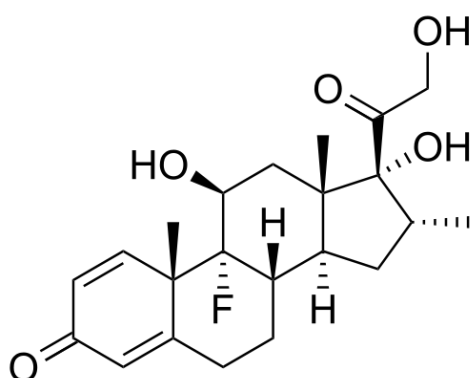
O cloridrato de pramoxina é amplamente utilizado em preparações farmacêuticas para uso tópico como géis, cremes, pomadas, ou seja, é considerado um bom fármaco para ser administrado através da via cutânea.

O fármaco é encontrado na forma de um pó cristalino, que pode variar de branco a praticamente branco e tem leve odor. Quanto a sua solubilidade, 1g do fármaco é solúvel em 35ml de clorofórmio, muito pouco solúvel em éter e livremente solúvel em água e em álcool (LACY, et al., 2010). Apresenta pH em torno de 4.5 e ponto de fusão por volta de 182°C (GENARO, 2005).

1.3.2 Acetato de Dexametasona

Com a introdução da cortisona e posteriormente da hidrocortisona, os anti-inflamatórios esteroidais se tornaram uma classe farmacológica de grande importância. Apesar de apresentarem diversos efeitos colaterais, ainda são muito utilizados como fármacos de escolha para o tratamento de várias patologias, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Este fármaco é frequentemente incorporado em pomadas, cremes, loções, aerossóis e microemulsões (URBAN et al, 2009). Sua fórmula molecular é representada pela estrutura apresentada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura química do acetato de dexametasona.



De acordo com a classificação biofarmacêutica, é um fármaco considerado de classe II, por apresentar elevada permeabilidade, porém baixa solubilidade.

O acetato de dexametasona é encontrado como um pó cristalino, branco ou praticamente branco, inodoro, sendo praticamente insolúvel em água (10mg/100ml, a 25°C), solúvel em acetona e metanol, livremente solúvel em etanol (1g em 42ml), solúvel em clorofórmio (1g em 165ml), ligeiramente solúvel em cloreto de metileno. (O'NEIL et al., 2007; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010). O ponto de fusão é em torno de 250°C com alguma decomposição (GENARO, 2005).

2. MATERIAIS

2.1 Matérias-primas

- Poly (propylene glycol) bis (2-aminopropyl ether) MM $\approx$ 400 – (POP 400), Sigma Aldrich;
- O,O'-Bis (2-aminopropyl) polypropylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropylene glycol MM $\approx$ 1900 – (POE 1900), Sigma Aldrich;
- Tetrahidrofurano, Synth;
- Álcool etílico absoluto PA, Qhemis Solução de HCl 2.0 M;
- Tampão Fosfato pH 7.2 com 0.5% de procetyl;
- Acetato de Dexametasona 100%, USP, DastechInternational, Inc;
- Cloridrato de pramoxina 100%, USP ;
- 3-(Trithoxysilyl)Propyl Isocyanate, 95%, Sigma-Aldrich;
- Carbonato de cálcio;

2.2 Equipamentos

- Balança semi-analítica Denver Instrument;
- Agitador magnético IKA;
- Cubetas de quartzo para espectrofotometria, capacidade 5mL;
- Canula com borda 7,75 Agilent;
- PHmetro digital PG1800 Gehaka;
- Rotaevaporador IKA RV 10 digital, banho frio microquímica MQ BTC 150-20 e bomba de vácuo Buchi Vac V-500;
- Pipetas graduadas de 1 a 10mL;
- Béqueres (80, 140, 200 ml);

- Provetas (100, 500 ml);
- Balão de 3 bocas (250ml);
- Balões volumétricos (10, 100, 250, 500 ml);
- Estufa;
- Dissolutor Agilent Technologies, 708 – DS, Dissolution Apparatus;
- Espectrofotômetro Cary 60 60 UV-Vis Agilent Technologies.

3. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi de analisar a capacidade de incorporação e liberação “in vitro” dos fármacos cloridrato de pramoxina (hidrofílico) e acetato de dexametasona (hidrofóbico) em sistemas híbridos orgânico-inorgânicos, utilizando misturas em diferentes proporções de materiais híbridos ureasil-polioxietileno (POE-1900) que possui um caráter altamente hidrofílico e ureasil-polioxipropileno (POP-400) com caráter altamente hidrofóbico.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Preparação dos híbridos orgânicos inorgânicos

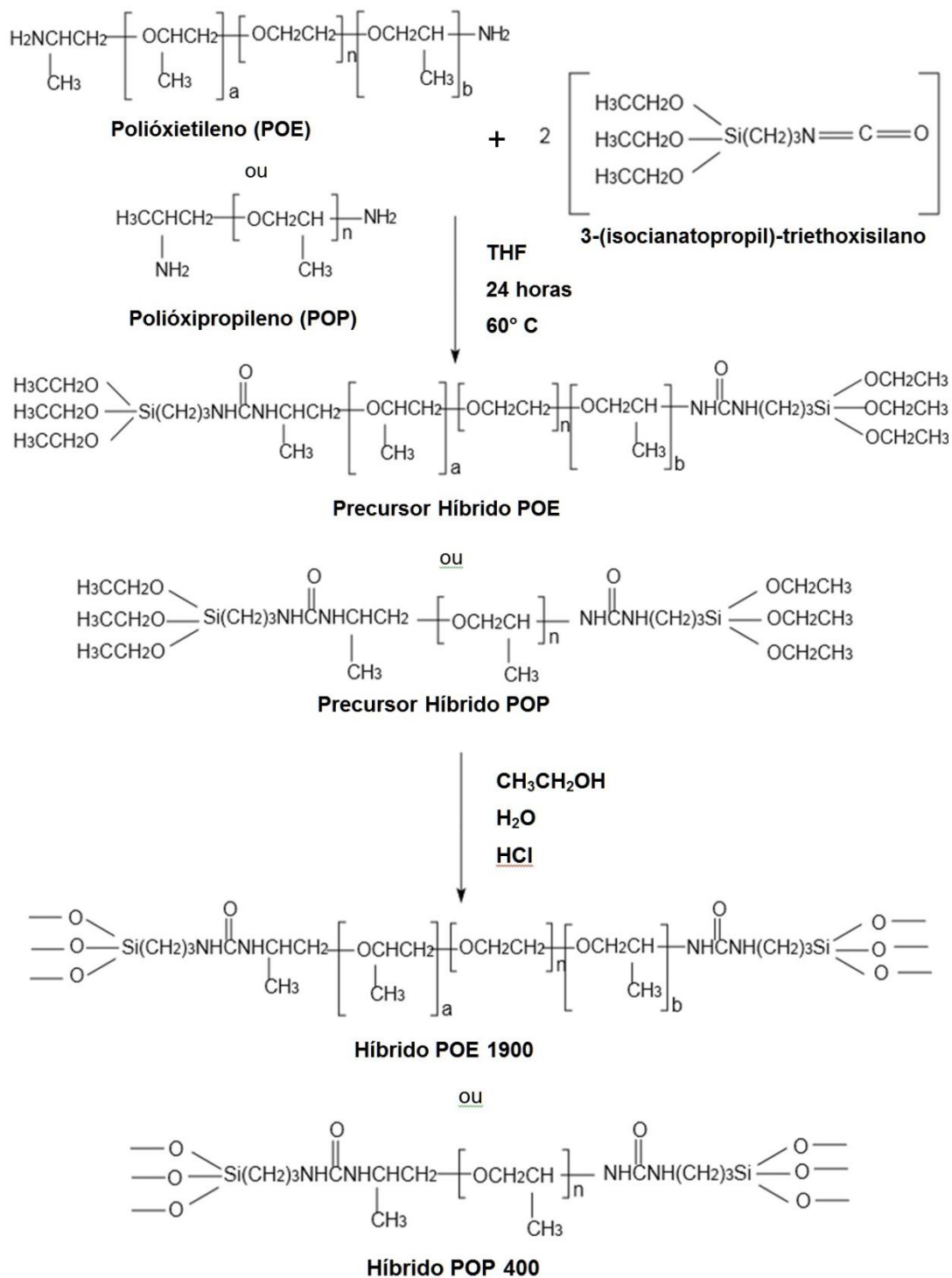
Pelo processo sol-gel, através da reação entre um alcoóxido modificado (3-isocianatopropiltrietoxissilano (IsoTrEOS)) e polímeros modificados ($\text{NH}_2\text{-POP-NH}_2$ e $\text{NH}_2\text{-POE-NH}_2$) foram obtidos os precursores híbridos ureasil-polioxietileno (POE) e ureasil-polioxipropileno (POP). A síntese é realizada sob refluxo, utilizando como solvente o tetrahidrofurano (THF), por um período de 18 a 24 horas, sob agitação constante a temperatura de 60° C. Após o período de síntese, o solvente é eliminado pelo processo de rotaevaporação. As quantidades de reagentes utilizadas estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1: Quantidades de reagentes utilizados na síntese das matrizes híbridas.

Matrizes Híbridas	THF	$\text{NH}_2\text{-POP-NH}_2$ ou $\text{NH}_2\text{-POE-NH}_2$	IsoTreos
Ureasil-POP-400	80 mL	25g	34,3 mL
Ureasil-POE 1900	90 mL	25g	6,3 mL

Submete-se os precursores a reações de hidrólise e condensação, para a obtenção das “lentes”. Tais reações ocorrem com a adição de etanol, água e um agente catalisador, podendo esse ser ácido (HCl) ou neutro (NH₄F). Nesta etapa é importante que seja feita uma boa homogeneização, para que todo o precursor reaja, formando uma amostra homogênea. Essas reações provocarão a eliminação de grupos OH, formando os géis híbridos (ureasil-POP e ureasil-POE) através de ligações covalentes entre as redes inorgânicas e orgânicas (DE ZEA BERMUDEZ, 1999). Todo o processo de síntese dos precursores, até a obtenção dos híbridos, encontra-se esquematizado na Figura 7.

Figura 7: Esquema da síntese para preparação do híbrido ureasil-POE 1900g/mol e ureasil-POP 400g/mol.



Durante o processo de hidrólise e condensação, após a adição de álcool e água, pode-se também modificar o perfil da matriz híbrida, adicionando proporções variadas de cada precursor, para analisar possíveis alterações nas características mecânicas e no perfil de liberação do fármaco, visando um aprimoramento do material híbrido.

As membranas ureasil-poliéter foram testadas anteriormente pelo grupo de pesquisa (estudo de histocompatibilidade das membranas ureasil-POP 400, ureasil-POE 1900 e colágeno comercial) para utilização em implantes subcutâneos (umas das possíveis utilizações desses materiais híbridos), e os resultados revelaram a necessidade do controle da composição dos polímeros a fim de obter um material que apresente simultaneamente baixo intumescimento e resposta inflamatória, como foi observado para a membrana ureasil-POP 400, mas com maior flexibilidade, como observada para a membrana ureasil-POE 1900.

Sabendo que o uso de diferentes proporções dos dois reagentes permite a obtenção de híbridos com diferentes funcionalidades, foram testadas diversas proporções, até a escolha das seguintes, esquematizadas na tabela 2.

Tabela 2: Proporções utilizadas de cada precursor híbrido

POP 1900	POP 400
10%	90%
20%	80%
30%	70%
40%	60%

4.2 Incorporação de fármaco a matriz híbrida

A incorporação do fármaco a matriz é feita durante o processo de hidrólise e condensação dos precursores, junto com adição de álcool e água. Esta etapa é suma importância para que a liberação do fármaco ocorra de maneira correta.

Os materiais híbridos possuem um sítio de ligação eletropositivo, o grupo NH do grupamento ureia, ao qual podem se ligar moléculas eletronegativas, e no caso é o sítio de ligação da porção orgânica com o grupo siloxano. Possuem também dois sítios de ligação eletronegativos, que são os oxigênios pertencentes ao éter da cadeia polimérica e os oxigênios do grupamento ureia, localizados na interface siloxano-polímero, que são capazes de solvatar as moléculas eletropositivas.

A interação do fármaco com o sítio de ligação pode ser modulada por alterações no pH das suspensões, com isso o pH dos géis é modificado de acordo com a especificação do fármaco e seu alvo de ação. Em algumas ocasiões, como no encapsulamento para liberação em alvos pré-determinados como no trato gastrointestinal – que dependendo da localização apresenta valores de pH diferentes - a liberação uniforme do fármaco é beneficiada pela modulação do pH do polímero.

Os fármacos incorporados foram o acetato de dexametasona, um anti-inflamatório esteroide, e o cloridrato de pramoxina, que é um anestésico local. A seleção do fármaco foi feita com base na sua eficácia e segurança comprovadas, e por constar na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2010).

4.3 Avaliação do perfil de liberação do fármaco

As matrizes híbridas ureasil-POP/POE nas diferentes proporções contendo 3% de cloridrato de pramoxina foram submetidas a testes “*in vitro*” de liberação em solução aquosa. O teste de dissolução foi realizado no equipamento AGILENT 108-DS. Os ensaios de dissolução das amostras híbridas foram realizados utilizando o método USP, em 500 mL de água mantida a $37 (\pm 0,5^{\circ}\text{C})$ e sob agitação constante de 50 rpm, utilizando o aparato 2 (pás).

As matrizes híbridas ureasil-POP/POE nas diferentes proporções contendo 3% de acetato de dexametasona foram submetidas a testes “*in vitro*” de liberação em solução tampão fosfato pH 7,2. Para garantir a condição “sink” foi adicionado 0,5% de procetyl. O teste de dissolução foi realizado no equipamento AGILENT 108-DS. As condições para realização foram 500 mL de tampão fosfato pH 7,2, com 0,5% de procetyl, em temperatura de $37^{\circ} (\pm 0,5^{\circ}\text{C})$, sob agitação constante de 50 rpm.

Para realizar a coleta das alíquotas de 5 mL, foi utilizada uma seringa com uma Cânula com Borda 7.75 AGILENT, sendo o volume coletado das resposto logo em seguida com o meio de dissolução. As amostras foram submetidas a análise no espectrofômetro UV-Vis AGILENT CARY 60. O teste foi realizado em triplicata.

4.4 Curva analítica

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; USP, 2002). A obtenção da curva analítica é o método para determinar a linearidade do teste.

4.4.1 Acetato de Dexametasona

Primeiramente foi preparada uma solução etanólica de dexametasona contendo 1 mg/mL. A partir dessa solução, foi obtida uma solução estoque, em tampão fosfato com 0,5% de procetyl, contendo 100 µg/mL, e então foram preparadas diluições com concentrações variando de 5 a 50 µg/mL, em triplicata. A curva analítica foi construída, relacionando as concentrações do fármaco à resposta obtida pelas leituras dos valores de absorbância na espectroscopia na região do UV, utilizando 241 nm como comprimento de onda (região de máxima absorção da dexametasona). Os testes foram feitos em triplicata.

4.4.2 Cloridrato de Pramoxina

A partir de uma solução estoque contendo 100 µg/mL, foram preparadas diluições com concentrações variando de 5 a 50 µg/mL, em triplicata. A curva analítica foi construída, relacionando as concentrações do fármaco à resposta obtida pelas leituras dos valores de absorbância na espectroscopia na região do UV, utilizando 286 nm como comprimento de onda (região de máxima absorção da pramoxina). Os testes foram feitos em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Incorporação dos fármaco a matriz híbrida

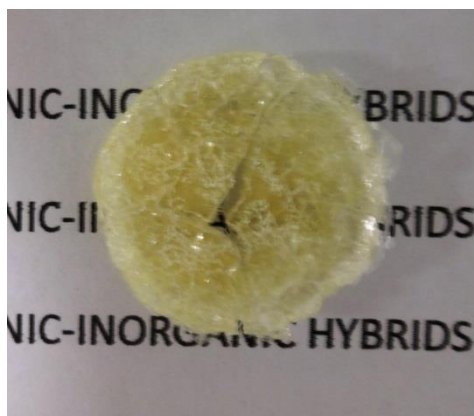
Devido ao fato do material híbrido ureasil-poliéter ser insolúvel na maioria dos solventes usuais, isso impossibilita a realização de uma análise mais minuciosa para quantificar a incorporação dos fármacos na matriz híbrida. Para então determinar a quantidade de fármaco que seria incorporado nas membranas híbridas orgânico-inorgânica, foi realizada uma avaliação visual, preliminar, com diferentes concentrações em porcentagem (%) de massa/massa de fármaco e precursor híbrido, tendo como concentração máxima incorporada de fármaco a porcentagem onde o fármaco encontrava-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz híbrida. No teste observou-se a possibilidade de incorporação de até 3% (m/m) do acetato de dexametasona e até 20% (m/m) do cloridrato de pramoxina, formando membranas como exemplificada na figura 8 (b). Tais resultados revelam a aplicabilidade comercial desses materiais híbridos, uma vez que em formulações comerciais para uso tópico contém 0,1 mg de dexametasona para cada grama da formulação (0,1% m/m) e em formulação contendo pramoxina, o fármaco é encontrado na concentração de 1% m/m. Porém, para efeito de comparação entre os fármacos, a quantidade padronizada para os testes de liberação foi de 3% (m/m) dos fármacos.

Figura 8:

- (a) Exemplo de membrana com o fármaco homogeneamente disperso na matriz híbrida.
- (b) Exemplo de membrana com o fármaco precipitado, não homogeneamente disperso na matriz híbrida.



(a)



(b)

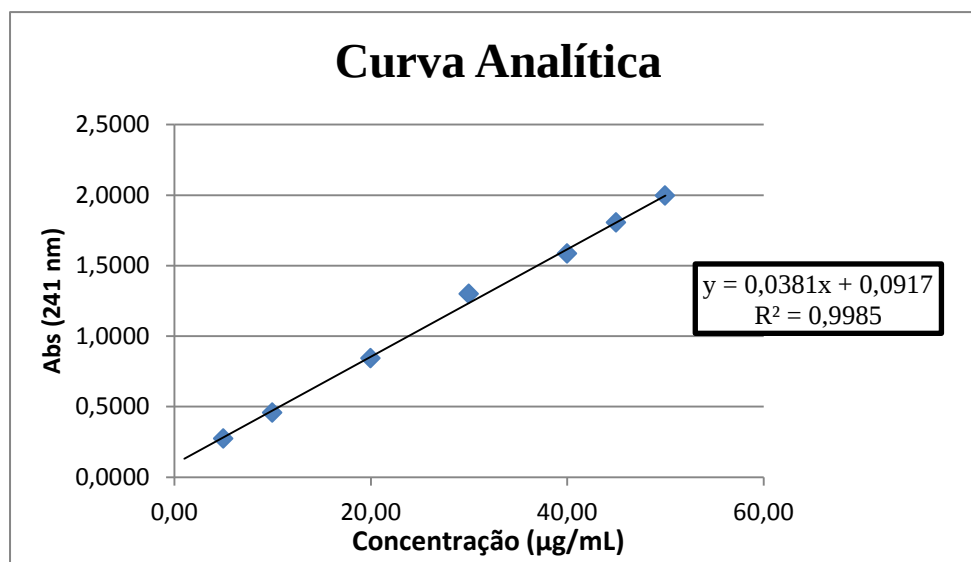
5.2 Curva analítica

5.2.1 Acetato de Dexametasona

A linearidade do método de quantificação do acetato de dexametasona por espectroscopia na região do UV foi determinada através da construção da curva analítica em meio tampão fosfato pH 7.2 utilizando diferentes concentrações de dexametasona, sendo a curva linear entre 5 e 50 µg/mL (figura 8).

Na análise realizada em tampão fosfato pH 7.2, o fármaco apresentou absorção máxima em 241 nm. A regressão linear forneceu a equação de reta: $y = 0,0381x + 0,0917$ e o coeficiente de correlação $r^2 = 0,9985$.

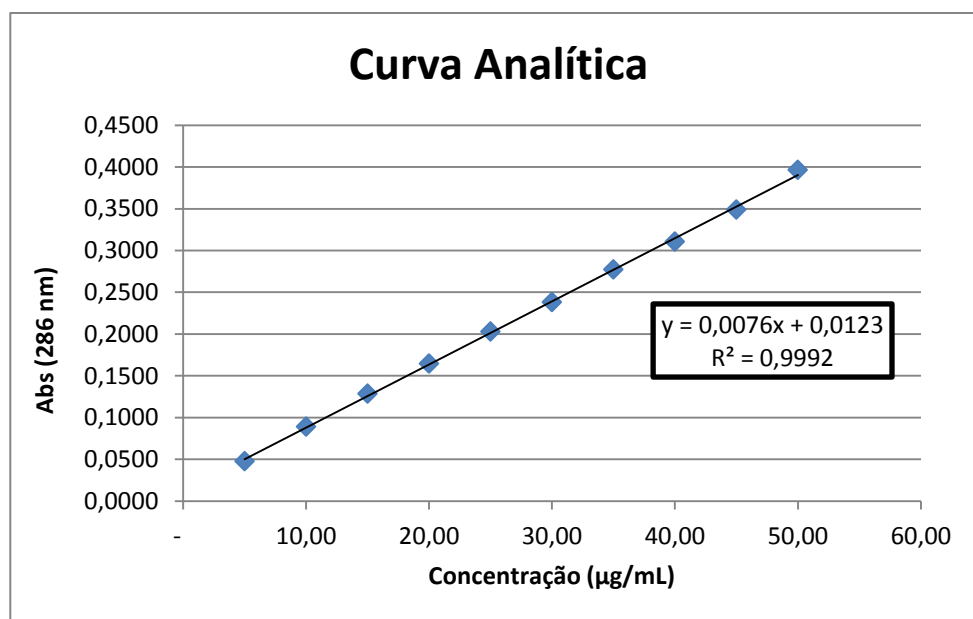
Figura 9: Curva analítica do acetato de dexametasona em tampão fosfato pH 7.2.



5.2.2 Cloridrato de Pramoxina

A linearidade do método de quantificação do cloridrato de pramoxina por espectroscopia na região do UV foi determinada através da construção da curva analítica em meio aquoso utilizando diferentes concentrações de pramoxina, sendo a curva linear entre 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$, conforme mostra a figura 9. Na análise realizada em meio aquoso, o fármaco apresentou absorção máxima em 286 nm. A regressão linear forneceu a equação de reta: $y = 0,0076x + 0,0123$ e o coeficiente de correlação $r^2 = 0,9992$.

Figura 10: Curva analítica do cloridrato de pramoxina em água.



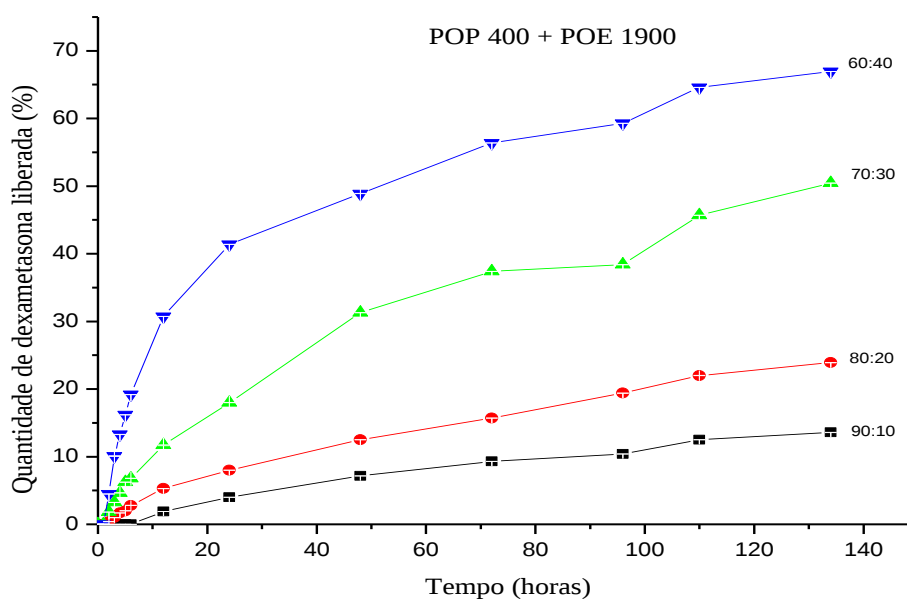
5.3 Teste de liberação do acetato de dexametasona

Para que ocorra a liberação do fármaco em sistemas matriciais, como as matrizes híbridas ureasil-poliéter, processos físico-químicos estão envolvidos como penetração do líquido na matriz, difusão do fármaco pela matriz, erosão do sistema polimérico e por fim uma combinação desses mecanismos (LYRA et al., 2007).

Entretanto, o que determina esses mecanismos será a seleção do material para o dispositivo, que independe de qual mecanismo ele vai liberar o fármaco, o importante é que seja capaz de controlar e manter a liberação do fármaco em níveis adequados dentro da faixa terapêutica para o tecido-alvo.

Os perfis de liberação “*in vitro*” das membranas ureasil-POP 400 + ureasil-POE 1900 com diferentes proporções de massa, para os fármacos acetato de dexametasona e cloridrato de pramoxina estão apresentado nas figuras 10 e 11, respectivamente.

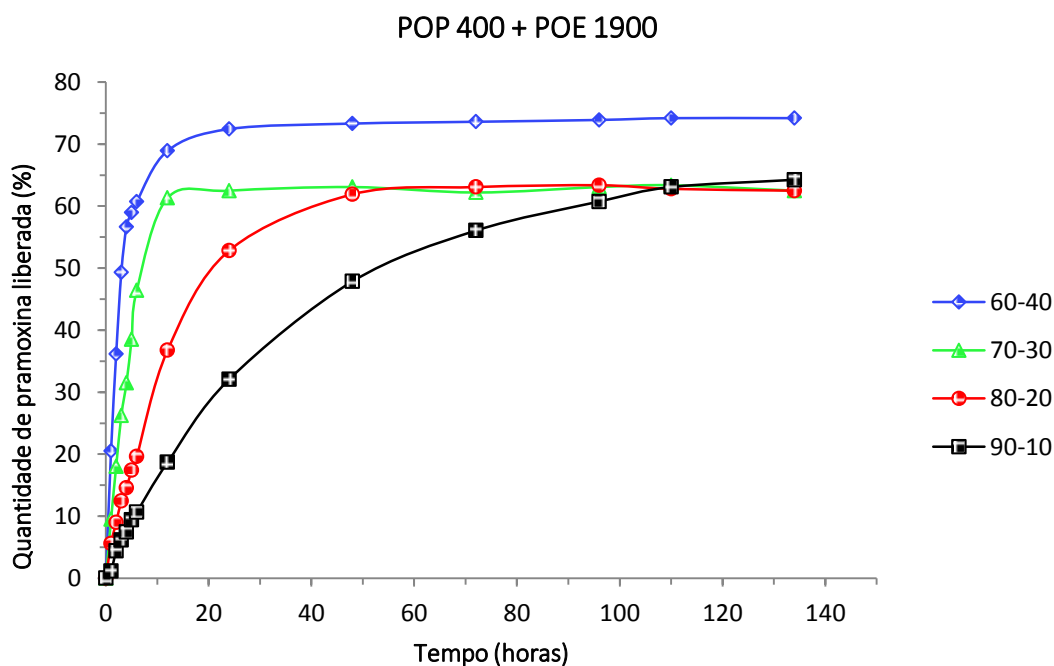
Figura 11: Perfil de liberação do acetato de dexametasona incorporada nas membranas híbridas Ureasil POP 400+ Ureasil-POE 1900 em diferentes proporções.



Como pode ser observado na figura 10, a liberação do fármaco atingiu um valor próximo a 70% somente após 132 horas transcorridas do teste, além do fato dessa liberação ocorrer de forma lenta e gradual, evidenciando a capacidade dessas matrizes híbridas em controlar a liberação, trabalhando com o equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico, utilizando diferentes proporções dos precursores POP 400 e POE 1900.

5.4 Teste de liberação do cloridrato de pramoxina

Figura 12: Perfil de liberação do cloridrato de pramoxina incorporada nas membranas híbridas ureasil-POP 400 + ureasil-POE 1900 em diferentes proporções.



De acordo com os resultados apresentados, a liberação do fármaco não atinge 100% em nenhuma das amostras testadas, no período de 132 horas (5 dias e 12 horas). Esse fato indica a possibilidade do controle da liberação a partir dessas matrizes híbridas por dias.

Comparando os resultados obtidos para a pramoxina e para a dexametasona, pode-se observar que nas amostras que possuem as maiores concentrações de ureasil-POP 400 levou-se um maior tempo para o início do processo de liberação, revelando a utilidade dessa matriz no controle de liberação dos fármacos. Este comportamento pode ser explicado pelas diferenças no caráter hidrofílico/hidrofóbico das cadeias poliméricas. O híbrido ureasil-POP 400 apresenta um caráter mais hidrofóbico em relação ao ureasil-POE 1900, devido ao grupamento CH_3 presente em sua cadeia polimérica, isso contribui para uma alta afinidade entre as cadeias poliméricas hidrofóbicas, dificultando a saída do fármaco. Além disso, a hidrofobicidade da cadeia diminui a afinidade do ureasil-POP 400 com o meio de dissolução resultando em um menor relaxamento das cadeias poliméricas e redução no grau de intumescimento da matriz. O perfil de intumescimento das membranas híbridas está intimamente relacionado com o perfil de dissolução e difusão do fármaco para fora da matriz (SANTILI et al., 2009; MOLINA., et al 2010). Para a membrana híbrida com maior concentração de ureasil-POE 1900, altamente hidrofílico, um alto grau de intumescimento ocorre nos primeiros minutos, o que facilita a difusão e a dissolução e do fármaco (SANTILI et al., 2009; MOLINA., et al 2010) no início do processo, acarretando em uma maior taxa de liberação do fármaco. A maior flexibilidade da cadeia polimérica do híbrido ureasil-POE 1900, devido ao seu maior grau de intumescimento, é o que ocasiona o aumento das taxas de liberação conforme ocorre o aumento da proporção nessas misturas.

Foi possível observar também que a taxa de liberação da dexametasona foi menor e muito mais lenta e constante em relação a pramoxina. Tal fato pode ser devido ao fato da dexametasona ser um fármaco mais hidrofóbico em relação à pramoxina, apresentando assim uma menor solubilidade no meio e/ou ficando mais tempo retido no interior da matriz, sendo mais difícil a sua difusão e dissolução.

Nota-se também que para somente para a pramoxina, após cerca de 80 horas do teste, em todas as amostras a taxa de liberação atingiu valores bem próximos. Isso pode ser devido ao fato de que como o fármaco é altamente hidrofílico, ele esteja mais incorporado na cadeia polimérica do ureasil-POE. Nas horas iniciais a cadeia polimérica do ureasil-POP (hidrofóbica) em maiores proporções, dificulta a penetração do meio na matriz e consequente dissolução do fármaco. Entretanto, ao conseguir penetrar na matriz, atinge a cadeia do ureasil-POE, intumescendo a cadeia polimérica, facilitando a difusão e a dissolução do fármaco ali disperso.

6. CONCLUSÕES

As matrizes híbridas ureasil-poliéter podem ser consideradas sistemas muito versáteis, pois permitiram incorporar fármacos com diferentes graus de hidrofília, tais como cloridrato de pramoxina e acetato de dexametasona, em concentrações relativamente elevadas. O uso desses materiais na liberação controlada de fármacos se mostrou eficiente e viu-se que é possível modular o perfil de liberação dependendo do tipo e da proporção de cada precursor das cadeias poliméricas escolhidas.

Podemos concluir que modulando a composição dos híbridos é possível alterar a sua organização estrutural, e, conseqüentemente modificar seu perfil de liberação dos fármacos. Dessa forma, através da mistura de matrizes híbridas com balanço hidrofílico/hidrofóbico controlado, podemos obter matrizes poliméricas híbridas orgânico-inorgânicas com características diferenciadas quando comparadas com os seus híbridos de composição pura.

Nota-se que para as primeiras horas, o caráter hidrofílico/hidrofóbico da molécula do fármaco não interfere muito no perfil de liberação, mas sim as características do material híbrido. Entretanto após decorridos cerca de 3 dias do teste, podemos observar uma liberação mais efetiva do fármaco cloridrato de pramoxina, sendo tal fato possivelmente devido ao alto grau de hidrofília do fármaco, sendo assim mais facilmente liberado com o intumescimento da matriz híbrida polimérica.

Pode-se observar que para as misturas de ureasil-POP 400/POE 1900 houve grandes mudanças nos perfis de liberação se comparadas com as matrizes híbridas de cada híbrido puro. Esses resultados indicam que é possível controlar a liberação do fármaco a partir de misturas de diferentes híbridos, obtendo-se diferentes perfis de liberação de acordo com a aplicabilidade farmacológica do fármaco em questão.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P.M.M.C.; MAGALHÃES, V.H.S. **Polimeros**, Faculdade Fernando Pessoa (UFP), Faculdade de Ciencias e Tecnologia, Dsciplina de Ciencias dos materiais , Porto, 2004.

ANDRADE, C. **Compendio de Nomeclatura Macromolecular**, UNLZ, Zamora. 1995.

AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. 20p. Laboratório de química do estado sólido, Instituto de química, UNICAMP. Campinas, 2002.

BELTING, M.; SANDGREN, S.; WITTRUP, A. **Adv. drug delivery rev.** v. 57, p. 505-527, 2005.

BENVENUTTI, E.V.; MORO, C.C.; COSTA, T.M.H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Quim. Nova.**, v. 32, n. 7, p. 1926-1933, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação nacional de medicamentos essenciais: RENAME**. 7. ed. Série B. Brasília: Editora MS, 2010. 249 p.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em setembro de 2013.

BRINKER, C. J.; SCHERRER, G. W.; Sol-Gel Science, **the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**, Academic: San Diego, 1990, cap. 2.

BRITISH PHARMACOPEIA 2010. 1. ed. London: The Stationery Office, 2009. 5300 p.

BRUNTON L. L.; LAZO J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman:** as bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.

CHAVANPATIL, M.D.; JAIN, P.; CHAUDHARI, S.; SHEAR, R.; VAVIA, P.R. Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastroretentive drug delivery system for ofloxacin. **Int. J. PHarm.**, v. 316, n. 1-2, p. 86-92, 2006.

CHIANG, C.-L.; MA, C.-C.M. Synthesis, characterization and thermal properties of novel epoxy containing silicon and phosphorus nanocomposites by sol-gel method. **J. Eur. Pol.**, v. 38, p. 2219-2224, 2002.

DE ZEA BERMUDEZ, V.; ALCACER, L.; ACOSTA, J. L. Synthesis and characterization of novel urethane cross-linked ormolytes for solid-state lithium batteries. **Solid State Ionics**, v.116, p. 197-209, 1999.

GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. “Smart” polymers and what they could do in biotechnology and medicine. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 17, p.335-340, 1999.

GENARO, A.R. (Ed) **Remington:** the science and practice of pharmacy. 21st. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2005. 2393 p.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

LACY, C.F.; ARMSTRONG, L.L.; GOLDMANN, M.P. Drug Information Handbook: A Comprehensive Resource for All Clinicians and Healthcare Professionals. 19th. ed. Ohio: Lexi-comp, 2010. 2200 p.

LOPES, L. **Utilização de uma Matriz Híbrida Orgânica na dinâmica de liberação controlada de fármacos**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Unesp, Araraquara, 2010.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 38, n.1, p.33-54, jan/mar, 2002.

MENDES, J.F. **Formadores de filmes híbridos orgânicos inorgânicos do tipo ureasil-poliéter para liberação controlada de fármacos**. 2012. 124 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2012.

MOLINA, E.F.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; BLANCHANDIN, S.; BRIOIS, V. Controlled Cisplatin Delivery from Ureasil-PEO1900 Hybrid Matrix. **J. Phis Chem. B.**, v. 114, p. 3461-3466, 2009.

NASCIMENTO A.; LARANJEIRA M.C.; FAVERE, V. T.; JOSUE A. Impregnation and release of aspirin from chitosan/poly (acrylic acid) graft copolymer microspheres. **J. Microencapsul.**, v.3, n.5, p.679-684, 2001.

O'NEIL, M.; HECKELMAN, P.; KOCH, C.; ROMAN, K.; KENNY, C. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 14th ed. New Jersey: Merck Sharp & Dohme Corp, 2007. 11947 p.

PEPPAS, N.A.; HILT, J.Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. **Adv. Mater.**, v. 18, n. 11, p. 1345-1360, 2006.

REKONDO, A.; FERNANDEZ-BERRIDI, M.; IRUSTA, L. Photooxidation and stabilization of silanised poly (ether-urethane) hybrid systems. **J. Eur. Pol.**, v. 42, n. 9, p. 2069-2080, 2006.

SANTILLI, C. V.; CHIAVACCI, L. A., LOPES, L., PULCINELLI, S. H., OLIVEIRA, A. G. Controlled Drug Release from Ureasil-Polyether Hybrid Materials. **Chem. Mater.**, v.21, p.463 - 467, 2009.

SCHUBERT, U.; HÜSING, N.; **Synthesis of Inorganic Materials**, Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha, 1a ed., 2001, cap. 4.

UNITED STATES PHARMACOPEA, 25th. ed. Rockville: United State Pharmacopeial Convention, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 32nd. ed. Rockville: United State Pharmacopeial Convention, 2010.

URBAN, M. C. C.; MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D. Development and validation of HPLC method for analysis of dexamethasone acetate in microemulsions. **Braz. J. PHarm. Sci.**, v. 45, n. 1, p. 87-92, 2009.

VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZ, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **Int. J. PHarm.**, v. 296, n. 1-2, p. 1-11, 2005.

YANO, S. Preparation and characterization of hydroxypropyl cellulose/silica micro-hybrids. **Polymer**, v. 35, n. 25, p. 5565-5570, 1994.

ZOPPI, R. A.; CASTRO, C. R.; YOSHIDA, I. V. P.; NUNES, S. P.; **Polymer** **1997**,38, 5705.

De acordo,

Araraquara, de Janeiro de 2014.

Rafael Luiz Bianchi
(Orientando)

Leila Aparecida Chiavacci
(Orientadora)