



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**Estudo de Pré-formulação de um novo agente
esquistossomicida 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-
imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4)**

SALVANA PRISCYLLA MANSO COSTA

**RECIFE
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo de Pré-formulação de um novo agente
esquistossomicida 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-
imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

SALVANA PRISCYLLA MANSO COSTA

**RECIFE
2012**

Costa, Salvana Priscylla Manso

Estudo de Pré-formulação de um novo agente esquistossomicida 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4) / Salvana Priscylla Manso Costa. – Recife: O Autor, 2012.

92 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2012.

Inclui bibliografia, anexo e apêndice.

1. Esquistossomose. 2. Tecnologia farmacêutica. 3. Pré-formulação. 4. LPSF/FZ4. I. Rolim Neto, Pedro José. II. Título.

UFPE

616.963

CDD (20.ed.)

CSS2012-49



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

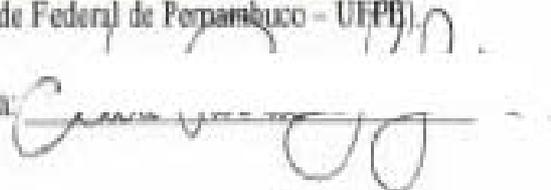
Recife, 06 de fevereiro de 2012.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 06 de fevereiro de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Dep^o de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPB)

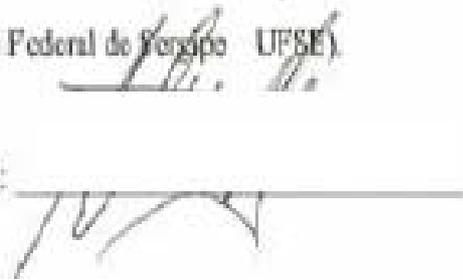
Assinatura: 

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Ana Cristina Lima Leite (Dep^o de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPB)

Assinatura: 

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

(Dep^o de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: 

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Lima Leite

Dedico a meus pais Ana Claudia Manso Costa,
Salvador Ferreira Costa neto, e a minha irmã
Betyna Manso Costa.

AGRADECIMENTOS

Não encontrei e jamais encontrarei palavras que descrevam suficientemente o quão grata me sinto por aqueles que colaboraram, ao longo desta etapa, para eu alcançar meus objetivos. O trabalho descrito aqui envolveu muitas pessoas que acreditaram na minha capacidade e me apoiaram nos devidos momentos. A lista abaixo é uma relação, sem ordem de preferência, de algumas dessas pessoas queridas, que tiveram sua devida participação nessa jornada. Algumas são de fato co-autores – oficiais ou não – desta Dissertação de mestrado, por terem ensinado, pipetado, cedido espaço nos seus laboratórios ou criticado e dado sugestões. Há, ainda, aquelas que insistiram para que eu não desistisse nos momentos mais difíceis, naqueles momentos em que nada dá certo, o experimento não funciona, surgem problemas de ordem prática, de ordem pessoal... e elas estavam ali, repetindo para eu não desistir, não jogar fora o que eu já havia produzido, que meu trabalho estava dando frutos, que essas fases difíceis fazem parte... enfim, pessoas que me mostraram como é a vida de fato. A todas elas, um obrigada verdadeiro, com muito carinho e a certeza de que serão sempre lembradas. Aos meus **familiares**, especialmente aos meus pais, **Salvador**, **Ana Claudia**, minha irmã, **Betyna** e meu namorado **Anderson Santos**, um obrigada com amor e carinho, pelo incentivo, apoio, paciência e amor.

Prof. Pedro José Rolim Neto

Prof^a Maria do Carmo Alves de Lima

Prof. José Lamartine Soares

Keyla Emanuele

Larissa Rolim

Rosali Maria

Magaly Lyra

Giovanna Rocha

Ricardo Tadeu

José Lourenço

Luíse Lopes

Fabiana Lícia

Lariza Alves

Danilo Augusto

Alexandre Couto

Diogo Rodrigo

Talma Costa

Ângela Maria

Edilanio Cavalcanti

Laércio Brandão

Luma Gomes

Rafaela Damasceno

Karla Camila

Ronmilson Marques

Luciana Arraes

Renato Lino

Diego Menelau

Colegas do laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM)

Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF)

Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Departamento de Física – UFPE

Departamento Química Fundamental – UFPE

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Ganhar a vida já não é
suficiente, o trabalho tem
que nos permitir vivê-la
também.**

(Peter Drucker)

RESUMO

O protótipo 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4) é um análogo imidazolidínico que apresenta potencial atividade esquistossomicida. Diante do fato de que a esquistossomose é uma doença negligenciada que acomete mais de 200.000 pessoas no mundo e que a quimioterapia representa o maior instrumento para seu controle, na quimioterapia apresenta o praziquantel como fármaco de escolha, no entanto, o mesmo é relativamente tóxico devido à sua baixa solubilidade, bem como, contar com apenas um fármaco é, certamente, uma situação perigosa, especialmente no que diz respeito à resistência do parasita. Neste contexto, faz-se de extrema importância a busca por novas moléculas bioativas como alternativa terapêutica para o tratamento da esquistossomose. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de preformulação do LPSF/FZ4 visando o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida. O estudo abrangeu a caracterização físico-química, estabilidade térmica e compatibilidade fármaco-excipientes por técnicas espectroscópicas (UV, IV, RMN e MS), MS, termoanalíticas (DTA, DSC e TG), bem como DRX, tamanho de partícula e área superficial além de ferramentas analíticas como equação de Van't Hoff e modelo de Ozawa para a avaliação da cinética de decomposição térmica. Os resultados obtidos da avaliação físico-química do LPSF/FZ4 frente a diferentes técnicas permitiu caracterizá-lo do ponto de vista morfológico e químico. O protótipo apresentou-se com 98% de pureza, funde a 228°C ($\Delta H = -178 \text{ Jg}^{-1}$) com pico endotérmico de fusão característico de uma forma cristalina que foi corroborado pela difração de raios-X onde revelou o padrão cristalino do fármaco, o qual também foi demonstrado pela eletromicrografia, como cristais aciculares bem definidos, o composto manteve-se termicamente estável até 320 °C onde a degradação térmica ocorreu em um estágio entre 320 – 370 °C com perda de massa em torno de 60%. Foi considerado um pó finíssimo com tamanho de partícula entre 10 e 100 μm , bem como uma área superficial em torno de 5,2277 m^2/g . No entanto, apresenta baixa solubilidade aquosa (0,01 mg/mL), devido a sua conformação estrutural apresentar fortes forças de atração interatômica, porém mostrou-se facilmente solúvel em acetona e acetonitrila. A equação Arrhenius e modelo de Ozawa mostrou um comportamento cinético de ordem um para a decomposição do protótipo, e um tempo de validade provisória calculado de quatro meses a 25 °C. O estudo de compatibilidade evidenciou possíveis interações químicas entre o LPSF/FZ4 com a lactose e o polissorbato, ambas associadas a diminuição da estabilidade térmica do protótipo, com redução considerável da temperatura de degradação e de fusão. Concluí-se que a abordagem integrada da tecnologia farmacêutica permitiu obter resultados com enfoques mais específicos e direcionados no sentido da obtenção de um produto farmacêutico estável e seguro.

Palavras-chave: Esquistossomose, LPSF/FZ4, pré-formulação, caracterização.

ABSTRACT

The prototype 3-(4-Chloro-benzyl)-5-(4-Nitro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione (LPSF/FZ4), an analogue imidazolidine has potential antischistosomal activity. Given the fact that schistosomiasis is a neglected disease that affects more than 200,000 people worldwide and that chemotherapy is the greatest instrument for its control, there is just praziquantel as the drug of choice, however, it is relatively toxic due to its low solubility and rely on only one drug is certainly a dangerous situation, especially with respect to the parasite resistance. In this context, it is extremely important to search for new bioactive molecules as therapeutic alternatives for the schistosomiasis treatment. Therefore, the objective of this research was to obtain a preformulation study of LPSF/FZ4 to develop a solid dosage form. The study covered the physicochemical characterization, thermal stability and drug-excipient compatibility by spectroscopic techniques (UV, IR, NMR, MS and SEM), thermal analysis techniques (DTA, DSC and TG) as well as for analysis at a particular level and their clusters respectively (XRD, particle size and surface area) and it was also used analytical tools such as van't Hoff equation and Ozawa model to evaluate the kinetics of thermal decomposition. The results of physicochemical evaluation of LPSF/FZ4 allowed obtaining its morphological and chemical characterization. The purity of the prototype was 98%, it melts at 228 °C ($\Delta H = -178 \text{ J.g}^{-1}$) with melting endothermic peak characteristic of a crystalline form that was confirmed by X-ray diffraction which revealed the crystalline pattern of the drug, which was also demonstrated by electron microscopy as acidulated crystals well defined, the compound remained thermally stable up to 320 °C where the thermal degradation occurred at a stage between 320 to 370 °C with mass loss around 60%. It was considered a fine powder with a particle size between 10 and 100 μm and a surface area around 5.2277 m^2/g . However, it has low aqueous solubility (0.01 mg/mL), due to its structural conformation which shows strong interatomic forces of attraction, but it was readily soluble in acetone and acetonitrile. The Arrhenius equation and Ozawa model showed a first-order kinetic behavior for the prototype decomposition, and an estimated time of provisional validity of four months at 25 °C. The compatibility study showed possible chemical interactions between the LSPF/FZ4 with lactose and polysorbate, both associated with a decreased of prototype thermal stability, with considerable reduction of degradation and melting temperature. It was concluded that the integrated approach to pharmaceutical technology allows getting more specific and directed results towards obtaining a stable and safe pharmaceutical product.

Keywords: schistosomiasis, LPSF/FZ4, preformulation, characterization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
Capítulo I	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
Capítulo II	43
4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LPSF/FZ4	43
Capítulo III	62
5 ANÁLISE TÉRMICA	62
6 CONCLUSÕES	83
7 PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE	89
ANEXO	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Técnicas utilizadas na caracterização do LPSF/FZ4.	46
Figura 2- Rota sintética do LPSF/FZ4.....	47
Figura 3- Espectro de absorção na região do Infravermelho do LPSF/FZ4.....	52
Figura 4- Representação ORTEP-3 da molécula do LPSF/FZ4.....	53
Figura 5 – Espectro de massas do LPSF/FZ4.....	54
Figura 6- Curvas TG e DSC do LPSF/FZ4 obtidas a 10°C/min, com massa de 3 mg, sob atmosfera de N ₂ em fluxo de 50 mL/min.	56
Figura 7- Difratoograma de Raios-X e MEV do LPSF/FZ4.	57
Figura 8- Distribuição de freqüência do tamanho das partículas de LPSF/FZ4.....	57
Figura 9- Interações de hidrogênio intermoleculares do LPSF/FZ4.	58
Figura 1- Fórmula estrutural do LPSF/FZ4.....	65
Figura 2- Fluxograma para a avaliação da estabilidade térmica do LPSF/FZ4.....	66
Figura 3- Curvas DSC e TG / DTG do LPSF/FZ4 obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL·min ⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C·min ⁻¹	68
Figura 4- Curva DSC obtida a 2°C/min e sob atmosfera dinâmica de N ₂ de uma amostra de LPSF/FZ4 e gráfico de linearização de van't Hoff.....	69
Figura 5- Curvas TG e o gráfico de Ozawa do LPSF/ FZ4 obtido em cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico.....	70
Figura 6- Curvas isotérmicas do LPSF/ FZ4 em diferentes temperaturas na atmosfera de N ₂ (50 mL min ⁻¹)	71
Figura 7- Gráfico de Arrhenius, ln t vs 1/T, para a decomposição térmica das amostras de LPSF/FZ4.	72
Figura 8- Curvas DSC do LPSF/FZ4 e excipientes obtidos em atmosfera dinamica de nitrogênio (50 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10°C min ⁻¹	73
Figura 9- Curvas TG das misturas físicas fármaco excipientes obtidos em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10°C min ⁻¹	74
Figura 10- Espectro na região do IV das misturas físicas 1:1 LPSF/FZ4 com Lactose, PVP e Polissorbato	75
Figura 11- Curvas isotérmicas da mistura física 1:1 entre LPSF/ FZ4 e lactose em diferentes temperaturas na atmosfera de N ₂ (50 mL min ⁻¹).	76
Figura 12 - Gráfico de Arrhenius, ln t vs 1/T, para a decomposição da mistura física 1:1 entre	76
Figura 13 - Curvas TG e o gráfico de Ozawa da mistura física 1:1 entre LPSF/FZ4 e lactose obtido em cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro epidemiológico da Esquistossomose por Região. Dados do PCE – Programa de Controle da Esquistossomose no período de Jan/2007-Set/2009.....	26
Tabela 1- Resultados experimentais para o estudo de solubilidade quantitativo do LPSF/FZ4	55
Tabela 1- Dados termoanalíticos do LPSF/FZ4 e das misturas binárias com excipientes	72
Tabela 2- Parâmetros cinéticos obtidos pelo método nao-isotérmico e energia de ativação (Ea) e o coeficiente de correlação (r) obtidos pelo estudo isotérmico.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -CD	β -ciclodextrina
CI	Complexo de inclusão
^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de H1
CMC	carboximetilcelulose
DNERu	Departamento Nacional de Endemias Rurais
DRX	Difração de raios X
DS	Dispersões Sólidas
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetia Derivada
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -Ciclodextrina
IC	Concentração Inibitória
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INERu	Instituto Nacional de Endemias Rurais
IT-TOF	Analisador de Massas por Tempo de Vôo
IV-TF/ATR	Infravermelho por Transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EM	Espectrometria de Massa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
PECE	Programa Especial de Controle da Esquistossomose
PF	Ponto de Fusão

PLGA	Ácido poli láctico-co-glicólico
PVP	Polivinilpirrolidona
PZQ	Praziquantel
QbD	<i>Quality by Design</i>
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
SUS	Sistema Único de Saúde
TDR	Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TG	Termogravimetria
TGR	Tiorredoxina Glutationa Redutase
UV-Vis	Ultra Violeta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Θ	Teta
Θ/s	Teta/segundo
δ	Deslocamento químico
[]	Concentração
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
Ea	Energia de ativação
J.g ⁻¹	Joules por grama
K	Kelvin
Kg	Kilogramas
KJ. mol ⁻¹	Kilo Joules por mol
M	Molar
MG	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitros
m/z	Massa/carga
Nm	Nanômetros
p/p	peso/peso
R	Constante dos gases
r ²	Coeficiente de correlação linear
T	Temperatura
v/v	volume/volume

B	Beta ou Razão de aquecimento
Δ	Delta ou Variação
ΔH	Variação da energia entalpica
Λ	Comprimento de onda
Π	Ligação pi
Σ	Ligação sigma

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença infecciosa parasitária. Apresenta uma evolução crônica, de gravidade variada, causada por um verme trematódeo – *Schistosoma mansoni* – que, no homem, habita os vasos sanguíneos do fígado e intestino (Guia de vigilância epidemiológica, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a esquistossomose é uma doença milenar que afeta mais de 200 milhões de pessoas distribuídas em 76 países na África, Ásia ou América, e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (WHO, 2011).

A quimioterapia representa a estratégia de controle da esquistossomose no mundo e hoje apenas dois fármacos têm sido utilizados para o tratamento desta doença: oxamniquina e praziquantel (WHO, 2011). Porém o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina apresentam limitações quanto à ação, como baixa eficácia, baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos, são necessários os estudos de novas alternativas terapêuticas para o tratamento desta doença, descoberta de novos alvos bioquímicos e o desenvolvimento de novas moléculas com potencial ação esquistossomicida (Frezza et al., 2007).

Diante do exposto o Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Dep. de Antibióticos/ UFPE, desenvolveu o fármaco 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4) que é um derivado imidazolidínico apresentando uma importante atividade esquistossomicida ao causar 100% de mortalidade dos vermes ao final de 15 dias de tratamento *in vitro*. Tal atividade foi atribuída à presença do grupo nitro na molécula que é considerado parasitofórico devido a sua contribuição favorável para a atividade antiparasitária de um grande número de nitro-derivados, notadamente furanos, tiofenos, tiazóis e imidazóis.

A presença deste grupo em derivados imidazolidina- 2,4-dionas conferiu melhor atividade esquistossomicida do que o praziquantel com 79% de mortalidade *in vivo* (Oliveira et al, 2004). Os resultados obtidos demonstraram que o composto estudado causou efeitos nos vermes, alterando, sobretudo a viabilidade, motilidade, pareamento e integridade do tegumento, sugerindo uma ação em receptores colinérgicos (Albuquerque, 2002).

O desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, através de diferentes aplicações tecnológicas, visa introduzir na terapêutica mundial, novas perspectivas para o tratamento da doença, sempre associando os preceitos da Tecnologia Farmacêutica as necessidades de produção de medicamentos com qualidade, segurança e eficácia, fazendo com que o acesso da população infectada ao medicamento seja ampliado. (Silva et al, 2011; Lyra et al, 2010)

As propriedades físico-químicas e biológicas de substâncias ativas podem influenciar o desempenho do medicamento e sua fabricação, devendo ser identificadas e discutidas (ICH, Q8). Neste sentido, para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, se faz necessário o conhecimento das propriedades fundamentais da molécula e outras propriedades derivadas do fármaco em pó, a fim de identificar e avaliar a pureza do material a ser analisado, escolha dos adjuvantes utilizados, bem como a estabilidade do fármaco e da formulação (Soares-sobrinho et al, 2010; Mamede et al, 2006).

O estudo da cinética de degradação de fármacos, compatibilidade fármaco-excipiente, e para produtos que contenham mais de uma substância ativa, compatibilidade fármaco-fármaco, bem como a determinação do prazo de validade do produto final, são também importantes atividades realizadas durante os estudos de pré-formulação (Oliva et al, 2006; ICH Q8). Como exemplo, técnicas termoanalíticas fazem a investigação dessas propriedades, sendo amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas, como técnicas rápidas e precisas de controle de qualidade e desenvolvimento de novos produtos (Soares-Sobrinho et al, 2010; Sovizi et al, 2010; Rodante et al, 2001).

As informações e os conhecimentos adquiridos a partir dos estudos de pré-formulação fornecem uma compreensão científica para apoiar a criação de um espaço de *design*, o que desenvolve uma base para a gestão dos riscos envolvidos capazes de prejudicar a qualidade do produto (ICHQ8; Rathore & Winkle, 2009).

Utilizando conceitos fundamentais da tecnologia farmacêutica, propomos neste trabalho a executar um programa estratégico de ações científicas e tecnológicas para contribuirmos, na introdução de novos agentes esquistosomicidas imidazolidínicos, mediante a realização de estudos de pré-formulação, através da caracterização físico-química do LPSF/FZ4, bem como a avaliação da estabilidade térmica, cinética de degradação e estudos de compatibilidade fármaco excipiente, a fim de promover um produto com qualidade.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo de pré-formulação de um novo agente esquistossomicida 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4).

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar caracterização físico-química da matéria-prima LPSF/FZ4;
- Determinar a estabilidade térmica do protótipo através de técnicas termoanalíticas como Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG);
- Avaliar a cinética de degradação térmica;
- Realizar estudo de compatibilidade física e química frente a excipientes.

Capítulo I

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigo I - Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica

Artigo aceito: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

3.1 Artigo I. **Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica**

Therapeutic alternatives to combat Mansonic Schistosomiasis

RESUMO

A esquistossomose mansônica é classificada pelo Ministério da Saúde como uma doença negligenciada, causada pelo trematódeo intravascular *Schistosoma mansoni*. As precárias condições de higiene estão diretamente relacionadas às áreas endêmicas, bem como à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico. Na atualidade, o praziquantel é o fármaco de escolha utilizado para o tratamento dessa doença. No entanto, o mesmo é relativamente tóxico devido à sua baixa solubilidade, além de relatos acerca de parasitas resistentes ao tratamento. Nesse contexto, faz-se necessário buscar novas alternativas terapêuticas que possam ser utilizadas no tratamento dessa doença. Esta revisão trata da busca por uma nova quimioterapia e sugere a possibilidade de que formas mais adequadas de vetorização de medicamentos já existentes sejam capazes de associar vantagens terapêuticas ao fármaco de escolha para o tratamento proposto, de forma que a população infectada receba seus benefícios.

Palavras-chave: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, Quimioterapia, Novas Alternativas Terapêuticas.

ABSTRACT

Mansonic Schistosomiasis is classified by the Ministry of Health as a neglected disease caused by intravascular trematode *Schistosoma mansoni*. The precarious hygiene conditions are directly related to the endemic areas as well as poverty and low economic development. Currently, praziquantel is the drug of choice used to treat this condition, however, it is relatively toxic, due to its low solubility, and there are reports about the parasite resistance to its treatment. In this context, it is necessary to search for new therapeutic alternatives that can be used in the treatment of this disease. This review covers the search for a new chemotherapy and suggests the possibility that the best ways of vectorization of existing drugs can be able to combine therapeutic benefits with the drug of choice for the treatment, aiming to benefit the infected population.

Keywords: Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, Chemotherapy, New therapeutic strategies.

INTRODUÇÃO

A esquistossomíase é uma doença que existe há milhares de anos, fato este comprovado por escritos sobre ovos calcificados de *Schistosoma mansoni* em rins de múmias egípcias (Filho & Silveira 2001).

Grande parte da população acometida reside em áreas endêmicas, relacionadas com precárias condições de higiene e inadequados recursos sanitários, estando essa endemia associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico. Essas áreas situam-se principalmente em comunidades rurais; porém, as áreas acometidas encontram-se em processo de expansão, passando a envolver cada vez mais os centros urbanos, assim como áreas litorâneas (Barbosa et al., 2000, 2001; Rouquayrol & Filho 2003; Almeida et al., 2008).

Atualmente, a Oxaminiquina e o Praziquantel são os fármacos utilizados para o tratamento das esquistossomoses; contudo, ambos apresentam limitações, como baixa eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica aguda, baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos (Frezza et al., 2007).

ESQUISTOSSOMOSE

Esquistossomose constitui um grande problema de saúde pública por estar associado à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, que geram a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer (Katz & Peixoto, 2000). É causada pelo trematódeo *S. mansoni*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro (vertebrado/homem) e as formas intermediárias (esporocistos primários, esporocistos secundários, cercárias) se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Inicialmente, a doença é assintomática, podendo evoluir para formas clínicas extremamente graves e levar o paciente a óbito (Ministério da Saúde, 2010).

O agente etiológico da esquistossomose é o *S. mansoni*, um helminto pertencente à classe dos *Trematoda*, família *Schistosomatidae* e gênero *Schistosoma*. São vermes digenéticos, delgados, de coloração branca e sexos separados, em que a fêmea adulta, mais alongada, encontra-se alojada no canal ginecóforo do macho (Brasil, 2005).

A presença de *Biomphalaria glabrata*, associada à presença de indivíduos com esquistossomose, pode estabelecer a endemia esquistossomótica, uma vez que a espécie é o

mais importante vetor do *S. mansoni* nas Américas devido ao alto potencial biológico de infecção natural e vasta distribuição (Barbosa et al., 2000; Paraense, 1972, 1963).

No Brasil, o *B. glabrata* encontra-se da Região Nordeste, ao longo da faixa costeira e áreas interiores adjacentes dos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe até o sudeste da Bahia. Na Região Sudeste, atinge a parte de Minas Gerais, o leste do rio São Francisco e o norte do Espírito Santo. Existem também focos periféricos isolados deste molusco no Maranhão, Pará, Goiás, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Couto, 2005).

Clinicamente, a esquistossomose pode ser classificada em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, observam-se dois sintomas bem característicos: a dermatite cercariana, provocada pela penetração das cercárias na pele, e a febre Katayama. A dermatite cercariana tem sua intensidade variável desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, perdurando até cinco dias após a infecção. Já a febre Katayama surge de três a sete semanas após a exposição, caracterizada por febre, anorexia, dor abdominal e cefaleia, diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca (Pordeus et al., 2008, Barbosa et al., 2004).

Na forma crônica, observa-se a preservação relativa da função hepática, predominando os sintomas decorrentes de hipertensão portal, caracteristicamente independente da ocorrência de lesão hepatocelular. No fígado, o substrato anatômico da doença, que leva à forma letal da esquistossomose *mansoni* com o quadro de hipertensão portal, é a extensa fibrose dos espaços periportais, a qual faz parte do processo de cicatrização que se segue à reação inflamatória granulomatosa aguda, ao redor dos ovos de *Schistosoma* aprisionados nos pequenos vasos hepáticos (Sales et al., 2009; Couto et al., 2008; Soares et al., 2007)

Sintomas pulmonares da esquistossomose podem apresentar-se como dispneia e tosse seca, mas a progressão para hipertensão pulmonar só ocorre em alguns casos. Formas pulmonares atípicas, como a pseudoneoplásica, são pouco frequentes e causam dificuldades quanto ao diagnóstico diferencial. No entanto, deve-se considerar a esquistossomose diante de problemas pulmonares, principalmente em áreas endêmicas (Rodrigues et al., 2009).

Têm-se relatos também do grave comprometimento neurológico durante a fase pós-infecciosa em doentes não imunes (Lambertucci et al., 2008). Na infecção primária por *S. mansoni*, relatou-se encefalite aguda e vasculite cerebral (Jaréguiberry et al., 2007); no entanto, a neuroesquistossomose assintomática parece ser mais frequente em associação com

as formas mais graves da infecção crônica. Já a mielorradiculopatia esquistossomótica é a mais grave e incapacitante forma ectópica da infecção por *S. mansoni*. Os sinais e sintomas iniciais da doença incluem: dor lombar e/ou dor em membros inferiores, paraparesia, disfunções urinária e intestinal e impotência nos homens (Lambertucci et al., 2009; Silva, 2008).

Em 1953, o Governo Federal realizou uma Campanha contra a Esquistossomose, sendo este o passo inicial do governo na tentativa de erradicar essa protozoose. Em 1956, o Instituto Nacional de Endemias Rurais (INERu) originou-se da Lei nº. 2743 de 6 de março, que criou o Departamento Nacional de Endemias Rurais (DNERu) no Ministério da Saúde. Sua estrutura organizacional era constituída pelo Núcleo Central de Pesquisas da Guanabara, Centro de Pesquisas René Rachou (MG), Núcleo de Pesquisas da Bahia e Centro de Pesquisas Ageu Magalhães (PE). Só no ano de 1970 foi criada a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) através do Decreto nº. 66623 de 22 de maio e, em 1975, foi implementado o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), que, cinco anos depois, passou a ser chamado de Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). Em 1990, houve a criação da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), que ficou responsável pelo PCE. Desde 1993, vem sendo implementada a descentralização das ações de controle da esquistossomose, intensificando-se a partir de 1999 e 2000, quando as Secretarias Municipais passaram a assumir gradativamente o controle dessa endemia em seu território (Fiocruz, 2010; Brasil, 2005).

Segundo dados da FUNASA, através do Programa de Controle da Esquistossomose, têm-se os seguintes dados em relação à positividade para parasitose em todas as regiões do País, no período de janeiro de 2007 a setembro de 2009 (Tabela 1) (DATASUS, 2010).

Tabela 1 - Quadro epidemiológico da Esquistossomose por Região. Dados do PCE – Programa de Controle da Esquistossomose no período de Jan/2007-Set/2009

REGIÃO	POPULAÇÃO AVALIADA	EXAMES POSITIVOS	PESSOAS TRATADAS
Região Norte	88.889	1.381	1.340
Região Nordeste	6.287.404	315.826	289.126
Região Sudeste	3.821.588	148.426	136.310
Região Sul	125.782	1.283	1.278
Região Centro- Oeste	1.846	11	11
TOTAL	10.325.509	466.927	428.065

Fonte: DATASUS, 2010

Desde o início da década de 1950 até o presente tem-se observado reduções nas prevalências de infecção, detectadas mediante inquéritos coproscópicos populacionais. Entretanto, tem ocorrido uma maior distribuição espacial, com o processo de urbanização e migração, o que pode ser amenizado por meio de investimentos em saneamento básico.

ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

O tratamento medicamentoso da esquistossomose é sempre limitado pela dificuldade do reduzido número de quimioterápicos disponíveis que exibissem eficácia, segurança e grande tolerabilidade. No início, foram utilizados o tartarato de potássio e antimônio, tartarato emético - introduzido em 1918 - seguido pelo dimercaptosuccinato de sódio e antimônio e o di-

(pirocatecol-2,4-dissulfonato) de sódio e antimônio, conhecido como estibofeno (Katz & Coelho, 2008).

Os derivados antimoniais, apesar de atuarem com eficácia contra as três principais espécies do gênero *Schistosoma*, o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum*, deixaram de ser usados no tratamento desta helmintose por ocasionarem inúmeros efeitos colaterais, como a trombocitopenia e outras discrasias sanguíneas (Novaes et al., 1999; Christopherson, 1918).

Posteriormente, foram utilizados o cloridrato de 1-*N*-*b*-dietil-amino-etil-amino-4-metil-9-tioxantona, a lucantona e seu metabólito principal, 1-*N*-*b*-dietil-amino-etil-amino-4-(hidroximetil)-9-tioxantona, a hicantona, que é eficaz, especificamente, contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium*, e também o fármaco 1-(5-nitro-2-tiazolil)imidazolidina-2-ona, o niridazol, eficaz contra o *S. haematobium* e o *S. japonicum*. Esses fármacos estão em desuso na terapia medicamentosa da esquistossomose devido a graves reações adversas, tais como lesões hepáticas e renais, convulsões, psicoses, alucinações visuais e auditivas, estados confusionais e outros efeitos indesejáveis sobre o sistema nervoso central (Katz & Coelho., 2008).

Atualmente, dois fármacos têm sido amplamente utilizados no tratamento da esquistossomose: oxamniquine e praziquantel. O praziquantel, conhecido estruturalmente como (\pm)- 2- ciclo- hexilcarbonil-1, 2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona, age, com eficácia, contra outros trematódeos e alguns cestódeos, exibindo atividade farmacológica muito superior à da oxamniquina, que age somente contra o *S. mansoni* e, principalmente, contra os machos adultos (Doenhoff et al., 2008).

Em pesquisa conjunta, realizada pelas indústrias E. Merck[®] e Bayer A.G.[®] em 1972, selecionou-se o praziquantel por exibir baixa toxicidade, maior eficácia e tolerabilidade entre outros compostos análogos testados (Novaes et al., 1999).

O praziquantel tem sido estudado experimentalmente em animais desde 1975, mostrando-se altamente eficaz contra infestações de várias espécies de trematódeos e cestódeos, principalmente: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. matheei*, *S. bovis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta* e *Diphyllobothrium latum*, *Cysticercus bovis* e *Cysticercus cellulosae*, *Echinochasmus fujianensis*, *Opisthorchis viverrini*, atuando contra os vermes maduros, imaturos e na fase larval dos cestódeos (Novaes et al., 1999).

A ação anti-helmíntica do praziquantel deve-se provavelmente à inibição da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente ao cálcio, que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espática. Como consequência, os helmintos se separam dos tecidos do hospedeiro e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado, ao passo que os helmintos intestinais são expelidos (Cioli, 1998).

Rocha et al. (1981) tentaram controlar o *Hymenolepis nana* em uma comunidade fechada, utilizando-se o praziquantel em repetidos tratamentos. Apesar da elevada percentagem de cura e dos vários tratamentos realizados, não foi possível o controle da himenolepíase.

Emanuel & Prata (1983) averiguaram se um aumento da dose de praziquantel de 50 para 70 mg/kg no tratamento de pacientes menores de 15 anos de idade seria acompanhada de maior eficácia terapêutica e qual a tolerância a essa dose mais alta que se aplicaria. Com a dose de 50 mg/kg curaram-se 59% das crianças e, com a dose de 70 mg/kg, 73,7%. Quanto à tolerância, não houve diferença entre as duas doses estudadas, ressaltando apenas que o praziquantel apresentado em cápsulas mostrou melhor aceitabilidade pelas crianças que sob a forma de comprimidos laqueados.

A oxamniquina apresenta menor custo em relação ao praziquantel (Korolkovas, 1999). É ativa nas formas intestinal e hepatoesplênica de infecções causadas exclusivamente pelo *S. mansoni*, espécie única no Brasil (Tzisin & Bronshtin, 1986). Foi lançada no Brasil pelos laboratórios Pfizer®, sob o nome de Mansil®, para as formas farmacêuticas cápsulas e suspensão (DEF, 1999; Korolkovas, 1999). Obtida em 1972 por Kaye e Woolhouse por meio de hidroxilação microbiana da tetraidroquinolina. Estruturalmente, corresponde ao (\pm)-1,2,3,4 – tetraidro-2-[(isopropilamino)metil]-7-nitro-6-quinolinometanol (Filho et al., 2001).

Almeida et al. (2008) sintetizaram o derivado 6-formil-oxamniquina - obtido por oxidação da oxamniquina com dióxido de manganês em diclorometano, à temperatura ambiente, por 24 horas - e avaliaram sua atividade biológica. Sua obtenção foi confirmada por espectrofotometria na região de infravermelho e espectroscopia de RMN ^{13}C e ^1H , apresentando atividade similar quando comparada à oxamniquina comercial (Mansil®). A substituição do grupo metilhidroxil pela função aldeído não alterou a sua atividade. Neste trabalho, sugeriu-se a importância do substituinte OH (hidroxila) no mecanismo de ação, uma vez que o derivado aldeídico obtido apresentou equivalente atividade biológica.

Em decorrência de um possível desenvolvimento de tolerância ou resistência ao praziquantel, busca-se a pesquisa e produção de novas drogas para prevenção e cura da esquistossomose (Lescano et al., 2004).

Tártaro emético, por exemplo, um fármaco antigo descartado, foi recentemente reconsiderado para o tratamento da esquistossomose como lipossoma conjugado. Aparentemente, a nova forma de apresentar o fármaco não só reduz a toxicidade, mas alarga as fases tardias da infecção parasitária em camundongos (Ribeiro dos Santos et al., 2006).

Devido ao praziquantel (PZQ) e à oxamniquina apresentarem limitações quanto à ação e casos de resistência ou tolerância, são necessários os estudos de novas alternativas que visam melhorar os fármacos já existentes, com a incorporação destes em lipossomas. Frezza et al., em 2007, verificaram a ação do praziquantel incorporado a lipossomas (lip.PZQ) sobre os ovos de *S. mansoni*, linhagem BH em camundongos *Mus musculus* (Swiss-SPF). Para tanto, foram testadas quatro doses de praziquantel e lip.PZQ (47, 60, 250 e 300 mg/kg), sendo que parte dos camundongos foi tratada após 30 dias de infecção e outra após 45 dias. A análise do oograma mostrou que a dose 300 mg/kg administrada no 45º dia de infecção foi mais eficaz, pois reduziu a oviposição pelas fêmeas de *S. mansoni*.

Em virtude do praziquantel possuir baixa solubilidade, o que leva os pacientes a ingerirem grande quantidade do medicamento, Jesus et al. (2001) propuseram a utilização da β -ciclodextrina como carreador capaz de melhorar a biodisponibilidade do praziquantel. Devido à sua cavidade hidrofóbica, em forma de cone, a β -ciclodextrina (β -CD) pode acomodar moléculas lipofílicas, melhorando, assim, sua solubilidade. Os autores avaliaram, inicialmente, através de métodos computacionais, qual ciclodextrina se complexaria com maior eficácia à molécula do praziquantel de acordo com o tamanho da molécula deste fármaco. Sendo obtidos complexos de PZQ/ β -CD na razão molar 1:1 e caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), a toxicidade foi testada em experimentos de hemólise.

Maragos et al. (2009) também verificaram o aumento da solubilidade em água do Praziquantel por complexação com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). Apesar da complexação PZQ com β -CD ter sido relatada na literatura, a interação do PZQ com HP- β -CD foi investigada pela primeira vez. Foram utilizadas a malaxagem e a liofilização para a formação do complexo de inclusão (sistemas binários), enquanto que a solubilidade foi determinada por espectroscopia de UV.

A solubilidade do PZQ foi aumentada por um fator de quatro, na presença da β -CD e da HP- β -CD. Portanto, a melhoria na solubilidade aquosa foi observada em relação ao fármaco que provavelmente deverá ter a biodisponibilidade melhorada. Além disso, melhora na solubilidade do PZQ por complexação HP- β -CD possivelmente permitirá a administração intravenosa de PZQ (Maragos et al., 2009).

Polímeros solúveis em água, como hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), polivinilpirrolidona (PVP), carboximetilcelulose (CMC), entre outros, têm sido relatados previamente para aumentar a complexação de várias moléculas com ciclodextrinas. (Ribeiro et al., 2005).

No entanto, apesar de existirem dados na literatura que relatam que o PVP aumenta a solubilidade e a taxa de dissolução do PZQ por complexos formados entre o fármaco e o polímero, a presença de PVP não afetou nem a capacidade de solubilização, nem a afinidade de complexação de ambos os complexos com β -CD e HP- β -CD para o PZQ, somente quando o polímero esteve presente na concentração de 0,5%, é que um ligeiro, mas, estatisticamente, não significativo aumento de β -CD e HP- β -CD na capacidade de solubilização foi observado (Maragos et al., 2009).

Nanopartículas poliméricas têm recebido grande atenção como potenciais sistemas de liberação controlada de fármacos pouco solúveis. Polímeros biodegradáveis são extensivamente usados no desenvolvimento desses sistemas e os poliésteres como ácido poliláctico; o poliglicólico e seus copolímeros, como o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), são os mais usados, considerando-se sua biocompatibilidade e biodegradação. Mainardes et al. (2006) utilizaram análise térmica para caracterizar nanopartículas de PLGA contendo um fármaco hidrofóbico, o praziquantel. Os resultados mostraram que o fármaco apresentou-se em estado amorfo ou em fase cristalina desordenada de dispersão molecular na matriz polimérica, e que o processo de microencapsulação não interferiu na estrutura química do polímero e manteve a integridade estrutural do fármaco.

Como mencionado em linhas anteriores, Praziquantel é atualmente fabricado e administrado como uma mistura racêmica. A adoção de um método de síntese enantiosseletiva deve, portanto, fornecer um fármaco que pode ser administrada em uma dose mais elevada, sem qualquer aumento de toxicidade ou eventos adversos (Doenhoff et al., 2008).

Embora tenha sido conhecido por anos que a atividade esquistossomicida apresenta principalmente no l-PZQ enquanto o outro enantiômero, designado d-PZQ, não contribui para a atividade esquistossomicida, nenhum estudo clínico em humanos relata que o não esquistossomicida (d-PZQ) contribui para os efeitos secundários conhecidos do PZQ racêmico (The synaptic leap, 2006). Existem vários métodos de produzir o componente esquistossomicida puro, porém são consideravelmente mais caros que os de produção racêmica.

O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) vem criando incentivos em pesquisa, desenvolvimento e inovação para a preparação a baixo custo do esquistossomicida puro, visto que oferece vantagens, como por exemplo, manter a dose igual à do praziquantel racêmico. No entanto, com menor frequência de administração, menos efeitos adversos, ou administração de dosagem maior, com a mesma frequência, verifica-se o mesmo perfil de efeitos adversos, porém, com uma probabilidade de redução do desenvolvimento de resistência, bem como o melhoramento da adesão ao tratamento, principalmente das crianças, visto que a forma enantiomericamente pura do Praziquantel pode diminuir o seu sabor amargo (Meyer et al., 2009).

A busca por vacina eficiente contra esquistossomíase mostra-se como objetivo desejável, tendo em vista que é um tratamento em massa, de alto nível de proteção e que apresenta baixo custo; porém, é ainda desafiador (McManus, 1999; Katz, 1999).

O progresso na área tem sido relativamente lento, mas pesquisas vêm demonstrando a capacidade de humanos adquirirem imunidade natural à infecção (Filho & Silveira 2001), uma vez que a imunização de animais experimentais com cercarias irradiadas é capaz de induzir até 80% de proteção contra uma infecção subsequente com parasita, considerando-se assim que seja possível obter uma vacinação eficiente contra esquistossomose.

Muitos antígenos que foram identificados há uma década continuam sendo testados hoje como possíveis vacinas contra a esquistossomose (McManus, 1999; Pearce, 2003), assim como várias formas de obtenção dessas vacinas, como, por exemplo, Vacina Recombinante, Vacina DNA e Vacina Peptídico (Instituto Butantan, 2010).

Seis biomoléculas foram selecionadas pela Organização Mundial da Saúde como promissoras candidatas à vacina contra a esquistossomose humana: a) glutathione S-transferase (GST 28 quilodáltons), b) proteínas musculares paramiosina (97 kDa), c) IrV-5 (62 kDa) d)

além de três antígenos de membrana; isomerase triose fosfato (28 kDa), e) Sm23 f) Sm14. (Bergquist & Colley, 1998).

Os antígenos acima citados foram testados em animais de laboratório e, infelizmente, a proteção conseguida não ultrapassou 60%, ou seja, houve apenas uma redução da carga parasitária (Filho & Silveira, 2001). Modelos matemáticos demonstram que uma redução na parasitemia de 45% seria suficiente para causar um enorme impacto na endemia. Portanto, os experimentos com vacina para *S. mansoni* têm induzido somente uma resistência parcial a infecção (Pearce, 2003).

Embora o desafio de desenvolver uma vacina contra esquistossomose seja uma tarefa difícil, os recentes avanços no campo da genômica, forneceram dados promissores acerca do desenvolvimento da mesma (Oliveira et al., 2008).

No início de 2010, o Instituto Butantan encerrou o Projeto Temático “Genoma funcional do *Schistosoma mansoni* aplicado ao desenvolvimento de vacinas”, que buscava avançar o conhecimento para o desenvolvimento futuro de uma vacina para a esquistossomose.

Essa nova abordagem é chamada de vacinologia reversa, pois permite a concepção de vacinas a partir da previsão de antígenos *in silico*. Das proteínas codificadas por ferramentas de bioinformática, o método realiza uma varredura em uma grande quantidade de genes/proteínas para identificar quais têm potencial de interação com o sistema imunológico do organismo, isto é, potencial para induzir uma resposta imune protetora. A equipe do Butantan selecionou 30 genes/proteínas para investigar tal potencial, utilizando-se de vacinas de DNA como forma de apresentação e apenas seis mostraram-se com maior potencial protetor, sendo possível aprofundar os estudos e confirmar a proteção para três deles (Instituto Butantan, 2010).

As informações obtidas através dessa abordagem são de grande importância para a compreensão da biologia do parasita e para a identificação de um conjunto de novas proteínas com características que indicam potenciais candidatos à vacinas (Oliveira et al., 2008). O transcriptoma também é estudado por vários pesquisadores, porém, de forma menos abrangente (Oliveira et al., 2008).

Embora alguns antígenos tenham demonstrado grande potencial, evoluindo para ensaios clínicos, ainda não existe uma vacina eficaz contra a esquistossomose, sendo,

provavelmente, necessária uma combinação de antígenos que induzam variados tipos específicos de resposta imune para atingir uma proteção elevada. O aparecimento de linhagens resistentes ao praziquantel tem sido relatado, levantando preocupações com relação à futura eficácia desse único fármaco utilizado no controle da esquistossomose. Portanto, além do desenvolvimento de novos fármacos, torna-se imperativo buscar medidas complementares à quimioterapia, e a vacinação é considerada a medida mais efetiva (McManus & Loukas, 2008).

No entanto, a vacina não pode ser encarada como medida única e definitiva, sendo importante considerar um conjunto de fatores no controle da esquistossomíase, como a educação para a saúde, a engenharia sanitária, aplicação em campo para o diagnóstico e busca continuada por fármacos, devendo ser implementados de maneira racional, a fim de se obter a erradicação total da doença sem ônus para população ou para o governo.

- Novos fármacos

A atividade esquistossomicida demonstrada pelas imidazolidinonas, oxadiazóis e de análogos estruturais norteiam as investigações na busca de novas drogas que apresentem maior seletividade pelos alvos celulares do *S. mansoni* (Neves et al., 2010; Albuquerque et al., 2005).

Vários derivados heterocíclicos pentagonais imidazolodionônicos vêm sendo sintetizados e avaliados frente a diversas possibilidades de atividades biológicas, como o 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4), que apresenta importante atividade esquistossomicida em estudos *in vitro*. Esse fármaco teve sua estrutura química idealizada a partir do niridazol, fármaco que já fez parte da quimioterapia da esquistossomose (Lima et al, 2001; Albuquerque et al., 2005; Pitta et al., 2006).

A atividade esquistossomicida do LPSF/FZ4 foi avaliada por Oliveira et al. (2004); entretanto, o fármaco apresenta solubilidade aquosa e taxa de dissolução extremamente baixas, que dificultam sua absorção e a reprodutibilidade de ensaios farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos. Estudos com o objetivo de melhorar as sua solubilidade através de técnicas de complexos de inclusão, dispersões solidas, sistemas multicomponentes estão em andamento na Universidade Federal de Pernambuco (Guedes, 2008).

Avanços importantes na química medicinal vêm mostrando a importância do uso de fármacos contendo metais de transição para o combate de diversas doenças, dentre elas o

câncer. Atualmente, a artrite reumatoide é tratada com medicamentos à base de ouro, como auranofina, aurothiomalate e aurotioglucose. Porém, o uso de fármacos contendo metal como agentes antiparasitários tem sido muito pouco explorado (Navarro, 2009)

Recentemente, foi realizado um estudo das avaliações dos antirreumáticos, tais medicamentos apresentam potencial atividade inibitória da enzima tiorredoxina glutationa redutase (TGR), como base na premissa de que também é uma enzima essencial para a sobrevivência do parasita *S. mansoni*, devendo ser um alvo chave do fármaco para o tratamento da esquistossomose. Complexos de ouro foram identificados para serem potenciais inibidores da TGR da esquistossomose (Navarro, 2009; Kuntz et al., 2007)

Auranofina foi o mais potente inibidor da TGR, com IC50 na gama baixa nanomolar. Além disso, houve uma significativa diminuição da carga parasitária em camundongos infectados (Kuntz et al., 2007).

Outra classe de compostos heterocíclicos importantes por apresentarem diversas atividades biológicas, tais como analgésico, anti-inflamatório, antibacteriano e atiparasitário, são os oxadiazóis.

Sayed et al. (2008) identificaram os oxadiazol 2-óxidos como novos compostos para quimioterapia da esquistossomose. Tais moléculas também mostraram-se inibidores da enzima do parasita TGR. Além disso, os compostos têm se mostrado de grande interesse farmacológico por causa de sua capacidade de doar NO através da ação da enzima. Portanto, o papel combinado da inibição da TGR e a subsequente liberação de NO são, sem dúvida, associados à mortalidade do parasita.

Poucos grupos de produtos de origem vegetal têm notáveis propriedades antiparasitárias, tais como alcalóides de quinolina contra *Leishmania amazonensis*, alcalóides indólicos contra Plasmodium e Entamoeba e sesquiterpenos contra Plasmodium. Investigações semelhantes com Schistosoma usando essas novas formulações deve ser considerada com urgência (Ribeiro dos Santos et al., 2006).

Felizmente, a artemisinina, ingrediente ativo da planta *Artemisia annua*, é uma lactona sesquiterpênica e seus derivados semissintéticos, tais como di-(5) artemeter, arteeter e artesunato, têm sido produzidos e foram reconhecidos amplamente com efeito antimalárico, assim como apresentou atividade esquistossomicida promissora (Doenhoff et al., 2008; Yang et al., 2005).

Esses compostos são bem tolerados e apresentam apenas rápidos efeitos secundários, mas o seu mecanismo de ação sobre a esquistossomose ainda não é totalmente compreendido. Artemisininas são de especial interesse porque apresentam efeitos mais ativos contra vermes imaturos que o PZQ e a oxamniquine. Depois de ensaios clínicos em massa, o Ministério da Saúde Pública Chinês aprovou artemeter e artesunato para a profilaxia da contra *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. haematobium*, uma ferramenta adicional para controlar a transmissão (Doenhoff et al., 2008; Yang et al., 2005).

Uma grande série de novos fármacos foi relatada recentemente por Vennerstrom et al. (2002) conhecidos como ozonídeos, estes provêm da substituição da fracção 1,2,4-trioxano da artemisinina precursor por uma fracção 1,2,4-trioxolane, como a espiro-1,2,4 - trioxolanes e dispiro 1,2,4-trioxolanes, que apresentaram-se como excelentes antimaláricos e promissora atividade esquistossomicida.

Baseados nisso, Yang et al. (2005) sintetizaram uma série de ozonídeos e avaliaram a sua atividade antiesquistossomal *in vivo* em camundongos infectados com *Schistosoma japonicum* e exibiram moderada potência antiparasitária.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esquistossomose continua sendo um problema de saúde pública no Brasil, mas, as ações de saneamento ambiental são reconhecidas como as de maior eficácia para a modificação das condições de transmissão da esquistossomose, que incluem: coleta e tratamento de dejetos; abastecimento de água potável; hidráulica sanitária e eliminação de coleções hídricas que sejam criadouros de moluscos.

A maioria das novas entidades químicas possui baixa solubilidade em água e subsequentes problemas para alcançar níveis sanguíneos terapeuticamente relevantes. A solubilidade de um fármaco constitui requisito prévio à absorção e obtenção de resposta clínica para a maioria dos medicamentos administrados por via oral. Diante disso, o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) da UFPE, em parceria com o Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF) da UFPE, vem buscando diversas técnicas como dispersões sólidas (DS), complexos de inclusão (CI), sistemas multicomponentes, entre outras técnicas, para melhorar a solubilidade desse fármaco,

objetivando o desenvolvimento de formas farmacêuticas a fim de disponibilizar no SUS uma nova alternativa terapêutica para esquistossomose mansônica.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; IRMÃO, J. I.; PEIXOTO, C. A.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V. et al. Tegumental Alterations in Adult *Schistosoma mansoni* Treated with Imidazolidine Derivatives. **Lat. Am. J. Pharm.**, Buenos Aires, v. 26, n. 1, p. 65-69, 2007.

ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; SILVA, A. C. A.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; BARBE, J.; PITTA, I. R. Synthesis and schistosomical activity of new substituted thioxo-imidazoline compounds. **Die Pharmazie**, Eschborn, v. 60, n. 1, p. 13-17, 2005..

ALMEIDA, A. E.; SOUZA, A. L. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FREZZA, T. F.; PINTO, M. C.; FERREIRA, A. G.; CHUNG, M. C. Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 749-754, 2008.

BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A. L. C.; ABATH, A. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 725-728, 2001.

BARBOSA, C. S. et al. Spatial distribution of Schistosomiasis Foci on Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99(supl. 1), p. 79-83, 2004.

BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S.; Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 337-341, 2000.

BERGQUIST, N. R.; COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccines: research to development. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 99-104, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6º Edição. Brasília, DF, 2005. 816 p

CHRISTOPHERSON, J. B. The successful use of antimony in bilharziosis: administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). **The Lancet**, London, v. 2, n. 4958, p. 325-327, 1918.

COUTO, J. L. A.; VIEIRA, R. C. S.; BARBOSA, J. M.; MACHADO, S. S.; FERREIRA, H. S. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, n. 4, p. 390-393, 2008.

COUTO, J. L. A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 38, n. 4, p. 301-304, 2005.

.DATASUS, 2010. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pce.def>>. Acesso em 29 mar. 2010.

DEF 98/99: Dicionário de especialidades farmacêuticas. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1998/1999. p. 615-616, 1138 p.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Birmingham, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.

EMANUEL, A.; PRATA, A. Praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni em crianças. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 178-181, 1983.

PARISE FILHO, R.; SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 123-135, 2001.

PARISE FILHO, R.; SOUZA, T. M.; ARAÚJO, M. B.; FERNANDES, N. A.; SILVEIRA, A. M. B. Análise químico-farmacêutica da oxamniquina e de suas especialidades farmacêuticas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 61-72, 2001.

FIOCRUZ, 2010. Disponível em: <www.coc.fiocruz.br/.../fundo_endemias_rurais.htm>. Acesso em 18 de janeiro 2010.

FREZZA, T. F.; MADI, R. R.; BANIN, T. M.; PINTO, M. C.; SOUZA, A. L. R.; GREMIÃO, M. P. D.; ALLEGRETTI, S. M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 2, n. 28, p. 209-214, 2007.

GUEDES, F. L. **Obtenção dos sistemas de dispersão sólida e complexos de inclusão para solubilidade de Benzilideno-Imidazolidina-2,4-diona e Benzilideno Tiazolidina-2,4-diona**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

INSTITUTO BUTANTAN. Genoma funcional de *Schistosoma mansoni* aplicado ao desenvolvimento de vacinas. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/portal/Pesquisa/Not%C3%ADcias/NoticiasPesquisaWindow?id=1216&action=2>>. Acesso em 18 mar. 2010.

JARÉGUIBERRY, S.; ANSART, S.; PEREZ, L.; DANIS, M.; BICAIRE, F. Neuroesquistossomose Caumes E. aguda: dois casos associados com vasculite cerebral. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, Baltimore, v. 76, n. 5, p. 964-966, 2007.

JESUS, M. B.; PINTO, L. M. A.; PAULA, E. Caracterização do complexo sólido Praziquantel em β -ciclodextrina. In: IX Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp; 2001, Campinas, **Anais**. Campinas, 2001.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 33, n.3, p. 303-308, 2000.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. **Acta Tropica**, Miami, v. 108. p. 72-78, 2008.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansoni. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 32, n. 6, p. 707-711, 1999.

KOROKOLVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 159 p.

KUNTZ, A. N.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SAYED, A. A.; CALIFF, L. L.; DESSOLIN, J.; ARNER, E. S. J.; WILLIAMS, D. L. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. **PLoS Med.**, Cambridge, v. 4, n. 6, 2007.

LAMBERTUCCI, J. R.; PEREIRA, S. R. S.; CARVALHO, T. A. Simultaneous occurrence of brain tumor and myeloradiculopathy in schistosomiasis mansoni: case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, n. 3, p. 338-341, 2009.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; ANDRADE, L. M.; QUEIROZ, L. C.; CARVALHO, V. T.; VOIETA, I.; ANTUNES, C. M. Técnicas de imagem na avaliação da morbidade na esquistossomose mansônica. **Acta Trop.**, Miami, v. 108, n. 2-3, p. 209-217, 2008.

LESCANO, S. Z.; CHIEFFI, P. P.; CANHASSI, R. R.; BOULOS, M.; NETO, V. A. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 71-75, 2004.

LIMA, M. C. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; OLIVEIRA, I. J.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de *Schistosoma mansoni* (cepa bh) frente a 3-benzil-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 34, n. 1, p. 150-151, 2001.

MAINARDES, R. M.; GREMIAO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 523-530, 2006.

MARAGOS, S.; ARCHONTAKI, H.; MACHERAS, P.; VALSAMI, G. Effect of Cyclodextrin Complexation on the Aqueous Solubility and Solubility/Dose Ratio of Praziquantel. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 10, n. 4, p. 1444-1451, 2009.

MCMANUS, D. P. The search for a vaccine against schistosomiasis: a difficult path but an achievable. **Immunol. Rev.**, Philadelphia, v. 171, n. 1, p. 149-161, 1999.

MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 21, n. 1, p. 225-242, 2008.

MEYER, T.; SEKLJIC, H.; FUCHS, S.; BOTHE, H.; SCHOLLMEYER, D.; MICULKA, C.; TASTE, A. New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment. **Neglec. Trop. Diseases**, San Francisco, v. 3, n. 1, p. 357-361, 2009.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Birmingham, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6º Edição. Brasília, DF, 2005. 816 p.

NAVARRO, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. **Coord. Chem. Rev.**, Amsterdam, v. 253, n. 11-12, p. 1619-1626, 2009.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. et al. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 193-222.

NEVES, J. K. A. L.; BOTELHO, S. P. S.; MELO, C. M. L. et al. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 3, p. 531-538, 2010.

NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 5-10, 1999.

OLIVEIRA, G.; FRANCO, G.; ALMEIDA, S. V. The Brazilian contribution to the study of the *Schistosoma mansoni* transcriptome. **Acta Trop.**, Miami, v. 108, n. 2-3, p. 179-182, 2008.

OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; FARIAS, L. P.; LEITE, L. C. C. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. **Acta Trop.**, Miami, v. 108, n. 2-3, p. 256-262, 2008.

OLIVEIRA, S. M.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidínicos. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 343-348, 2004.

OPAS, 2010. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/prevencao/temas.cfm?id=43&area=Conceito>>. Acesso em 12 jan. 2010.

PARAENSE, W. L. Fauna Planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S. et al. **Introdução a Geografia Médica do Brasil**. São Paulo; Edgard Blücher do Brasil, 1972. p. 213-239, 568 p.

PARAENSE, W. L. The nomenclature of Brazilian planorbids. III. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 1-7, 1963.

PEARCE, E. J. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. **Acta Trop.**, Miami, v. 86, n. 2-3, p. 309-313, 2003.

SILVA, L. C. S.; MACIEL, P. E.; RIBAS, J. G. R.; PEREIRA, S. R. S.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, L. S.; ANTUNES, C. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Mielorradiculopatia esquistossomótica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 37, n. 3, p. 261-272, 2004.

PITTA, M. G. R.; SILVA, A. C. A.; NEVES, J. K. A. L.; SILVA, P. G.; IRMÃO, J. I.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101(Suppl. I), p. 313-316, 2006.

PORDEUS, L. C.; AGUIAR, L. R.; QUININO, L. R. M.; BARBOSA, C. S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

ROCHA, R. S.; CARVALHO, O. S.; SANTOS, J. S.; KATZ, N. Tentativa de controle de *Hymenolepis nana* através de tratamentos clínicos repetidos, com praziquantel, em uma comunidade fechada. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 364-370, 1981.

RODRIGUES, G. C.; LACERDA, D. C.; GUSMÃO, E. S.; COLARES, F. A.; MOTA, V. T. Forma pseudoneoplásica de esquistossomose pulmonar crônica sem hipertensão pulmonar. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 484-488, 2009.

ROUQUAYROL, M. Z.; FILHO, N. A. **Epidemiologia e Saúde**. 6 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 708 p.

SALES, D. M.; SANTOS, J. E. M.; SHIGUEOKA, D. C.; LEÃO, A. R. S.; NETO, R. C.; BORGES, D. R.; D'IPPOLITO, G.; SZEJNFELD, J. Correlação interobservador das alterações morfológicas das vias biliares em pacientes com esquistossomose mansoni pela colangiorressonância magnética. **Radiol. Bras.**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 277-282, 2009.

SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. Identification of Oxadiazoles as New Drug Leads for the Control of Schistosomiasis. **Nat. Med.**, New York, v. 14, n. 4, p. 407-412, 2008.

SILVA, C. M. R. **Perfil clínico e epidemiológico dos portadores de Mielorradiculopatia Esquistossomótica atendidos em uma unidade de saúde de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Curso de Mestrado em Saúde Pública, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

SOARES, S.; VIRMONDES JÚNIOR, R.; SILVA, D. T. N.; SOUZA, H. M. Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 321-325, 2007.

THE SYNAPTIC LEAP. **Enantioselective Synthesis of Praziquantel**. 2006. Disponível em: <<http://www.thesynapticleap.org/schist/projects>>. Acesso em: 19 maio 2010.

TZISIN, Y.; BRONSHTIN, A. M. Advances in the development of new anthelmintics. **Pharm. Chem. J. Engl. Trans.**, New York, v. 20, n. 10, p. 696-713, 1986.

U.S. PATENT. Vennerstrom, J. L.; Dong, Y. X.; Chollet, J.; Matile, H.; Padmanilayman, M.; Tang, Y. Q.; Charman, W. N. **SPIRO AND DISPIRO 1,2,4-TRIOXOLANE ANTIMALARIALS**. US 6,486,199 B1, 21 jan. 2001, 26 nov. 2002.

YANG, Z.; WU, W.; LI, Y.; WU, Y. Design and Synthesis of Novel Artemisinin-Like Ozonides with Antischistosomal Activity. **Helv. Chim. Acta**, Zürich, v. 88, n. 11, p. 2865-2872, 2005.

Capítulo II

4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LPSF/FZ4

4.1 Artigo II – Caracterização físico-química do novo agente esquistossomicida: 3-(4-CLORO-BENZIL)-5-(4-NITRO-BENZILIDENO)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA (LFPS/FZ4)

Artigo a ser submetido ao AAPS American Association of Pharmaceutical Scientists

4.1 Artigo II - Caracterização físico-química do novo agente esquistossomicida: 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4)

Resumo

O presente estudo objetivou a caracterização físico-química de uma nova molécula, LPSF/FZ4 um derivado heterocíclico pentagonal imidazolidínico que apresenta atividade esquistossomicida, visando o conhecimento profundo da molécula a fim de desenvolver uma base de dados para promover a obtenção de um produto com qualidade, através do emprego de diversas ferramentas analíticas, tais como, IV, UV-Vis, MS, RMN'H, DRX, determinação do tamanho de partícula, área superficial, bem como MEV, DSC/TG e estudo de solubilidade. Os resultados obtidos foram de fundamental importância, fornecendo informações relevantes para o delineamento racional de medicamentos a base de LPSF/FZ4.

Palavras chave: LPSF/FZ4, caracterização físico-química, esquistossomose.

INTRODUÇÃO

Hoje, a quimioterapia representa o único recurso imediato para reduzir a prevalência e a incidência da esquistossomose no mundo, o que justifica a necessidade imperiosa da busca de novos compostos esquistossomicidas (MONTRESOR., 2011).

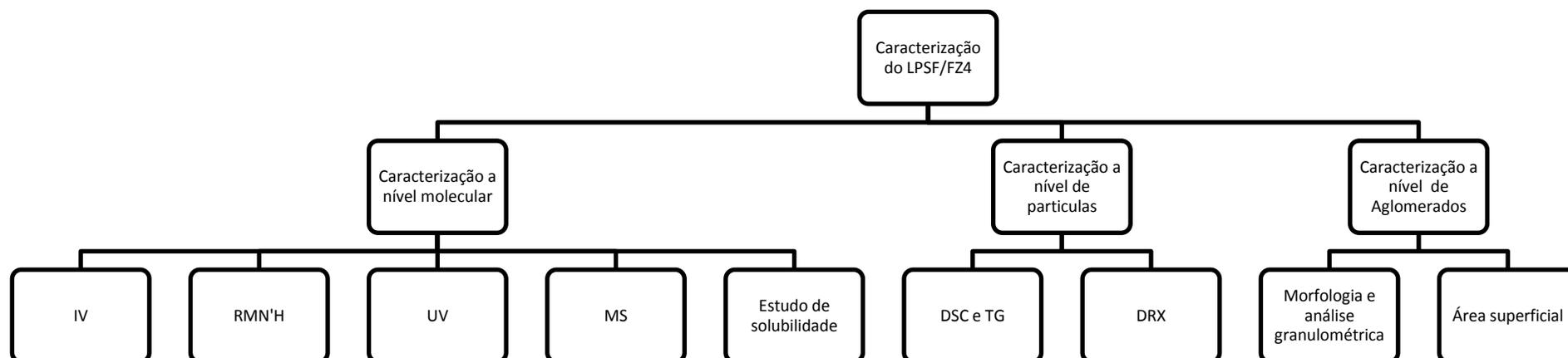
Diante do fato do niridazol, fármaco utilizado no passado no tratamento da esquistossomose, apresenta-se no momento como um protótipo pela presença do anel imidazolidinônico, o qual confere além da atividade anti-helmíntica, outras propriedades biológicas (ALBUQUERQUE et al., 2002), sendo assim, o Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF) sintetizou o 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (FZ4), o qual faz parte de uma ampla classe de compostos ativos derivados heterocíclicos pentagonais imidazolidínicos e que apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* ao causar 100% de mortalidade dos vermes ao final do período de tratamento. Tal atividade foi atribuída à presença do grupo nitro na molécula que é considerado parasitofórico devido a sua indispensável, ou no mínimo favorável, contribuição para a atividade antiparasitária de um grande número de nitro-derivados, notadamente furanos, tiofenos, tiazóis e imidazóis. A presença deste grupo em derivados imidazolidina-2,4-dionas conferiu melhor atividade esquistossomicida do que o praziquantel com 79% de mortalidade *in vivo* (Oliveira et al, 2004).

Por se tratar de um protótipo, as propriedades físico-químicas do LPSF/FZ4 são praticamente desconhecidas. Para isso, é de suma importância a caracterização físico-química do princípio ativo, pois dessa forma, estabelece-se um padrão de identificação da molécula, o que garante a qualidade, segurança e eficácia do fármaco, tornando-o adequado para a realização de estudos de pré-formulação e assim promover um desenvolvimento racional de medicamentos (ICH Q6.,1999). Pode-se perceber a importância da caracterização do composto quando verifica-se que diversos aspectos referentes à substância ativa, como presença de diferentes formas polimórficas, impurezas, tamanhos e formatos cristalinos, textura, propriedades de atrito do fluxo e de formação, entre outros aspectos, podem certamente alterar a produção, biodisponibilidade e estabilidade dos medicamentos e, portanto a eficácia, segurança e qualidade do mesmo (MAXIMINIANO; COSTA; SOUZA., 2010).

Além disso, o órgão governamental dos Estados Unidos que procura controlar todos os aspectos envolvendo medicamentos no país, *Food and Drug Administration* (FDA), implementou o conceito de *Quality by Design* (QbD) em suas recomendações a cerca de medicamentos que enfatiza que a qualidade de um produto deve ser construída com um profundo conhecimento do mesmo (FDA, 2011). O conhecimento do produto é um dos focos deste conceito porque as informações e os conhecimentos adquiridos a partir dos estudos para o desenvolvimento farmacêutico fornecem uma compreensão científica para apoiar a criação de um espaço de *design*, o que desenvolve uma base para a gestão dos riscos envolvidos capazes de prejudicar a qualidade. Por esse motivo, o QbD vem sendo implementado na indústria farmacêutica (ICH Q8., 2009).

A fim de implementar o QbD para garantir a qualidade farmacêutica, este trabalho traz métodos que garantem a caracterização físico-química do LPSF/FZ4 em nível molecular, particular e de seus aglomerados. Tal divisão (Figura 1) foi feita para melhor entendimento das características do protótipo, tendo em vista que as mesmas nos diferentes níveis estruturais podem influenciar nas etapas do desenvolvimento de um produto farmacêutico.

Figura 1- Técnicas utilizadas na caracterização do LPSF/FZ4.



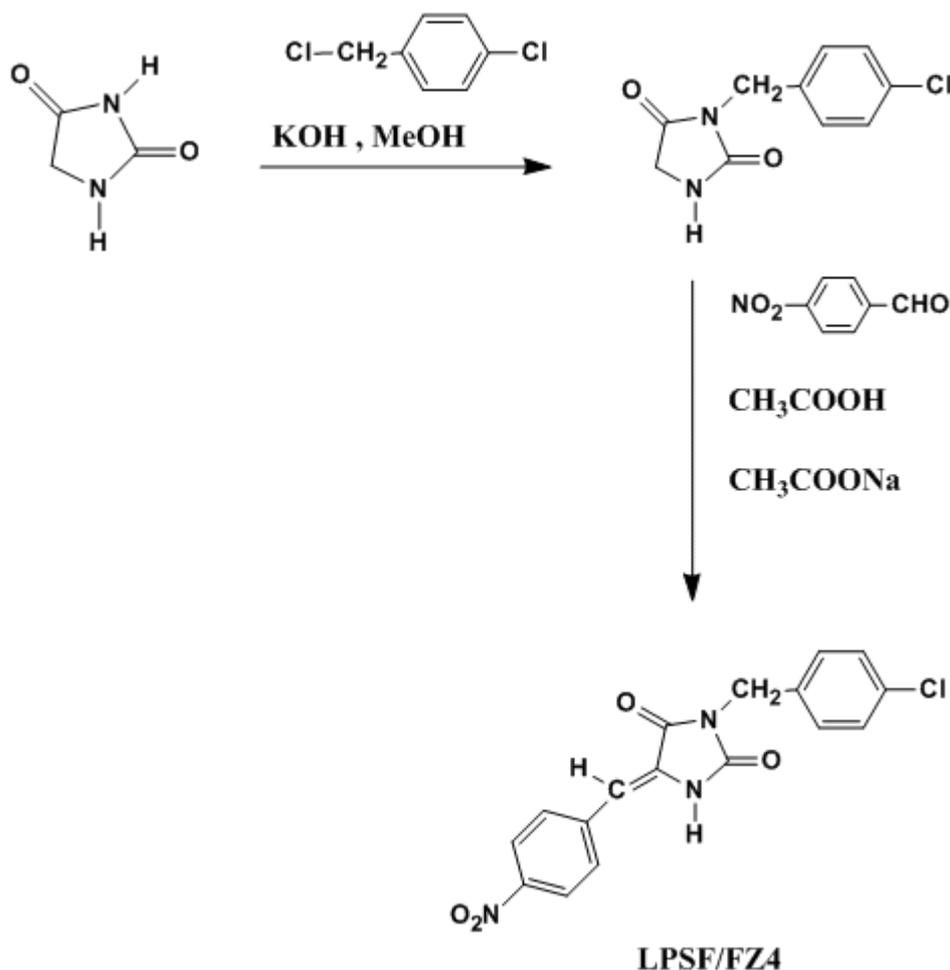
PARTE EXPERIMENTAL

SÍNTESE DO PROTÓTIPO

LPSF/FZ4 (Lot: 1, 98,00%), 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona, foi fornecido pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (LPSF/UFPE). Nos testes de solubilidade foram utilizados etanol, acetonitrila Grau HPLC (J.T.BAKER[®]), metanol e acetona P.A. (Dinâmica[®]), e água destilada.

O LPSF/FZ4, foi sintetizado pela N-alkilação do anel imidazolidínico utilizando-se cloreto de 4-clorobenzila, seguido da condensação tipo Knoevenagel com 4-nitro-benzaldeído (Figura 2) obtido com rendimento de 69% e fator de retenção (rf) de 0,56 no sistema de solventes clorofórmio/ metanol (95:5). Apresentou massa molecular igual a 357,06 e ponto de fusão de 224 – 226°C.

Figura 2- Rota sintética do LPSF/FZ4



CARACTERIZAÇÃO A NÍVEL MOLECULAR

Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de 4000 a 650 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1} .

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

Os espectros de ^1H RMN unidimensional foram obtidos em um espectrômetro Varian® VNMRS-400, operando na frequência de 399,7 MHz utilizando CDCl_3 como solvente. A solução do protótipo (0,2 M) foi adicionada em tubos de 5 mm de RMN, totalizando um volume de 600 μL . Como referência para a calibração do espectro de RMN utilizou-se o tetrametilsilano, TMS (deslocamento químico = 0). O experimento foi realizado a temperatura de 27°C. A seqüência de pulsos utilizada para obtenção do espectro de RMN de ^1H foi a de pulso simples (*single pulse*) com pulso de 5,3 microsegundos, correspondente a 45°, tempo de aquisição de 2,049 s, 32 transientes, largura espectral de 6410,3 Hz e 262k pontos de memória.

Espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV)

Foram preparadas soluções do LPSF/FZ4 (10 $\mu\text{g/mL}$, n=3) 98% lote 1, utilizando como solvente acetonitrila e água purificada (35:65). Os espectros foram traçados com varreduras na região do ultravioleta na faixa entre 200 e 600 nm, utilizando um espectrofotômetro de absorção UV-visível Shimadzu® para a determinação do comprimento de onda específico do protótipo.

Espectrometria de massas (MS)

O espectrômetro utilizado para analisar as amostras do LPSF/FZ4 foi um equipamento marca Shimadzu®, com ionização por nebulização térmica e analisador de massas por tempo de voo (IT-TOF), sendo utilizado para diluição do protótipo em acetonitrila, com scan de 80 a 300 m/z.

Estudo de Solubilidade

Preparação das soluções e amostras

O teste de solubilidade foi realizado (à 25 °C) com diferentes solventes (água, álcool etílico absoluto, metanol, acetonitrila e acetona). As amostras de LPSF/FZ4 foram solubilizadas nos solventes já citados, ultrassonicadas por 5 min e posteriormente filtradas obtendo-se uma solução supersaturada, uma alíquota foi retirada dessas soluções para diluição, utilizando-se como sistema de solventes fase orgânica: água purificada (35:65, v/v) até atingir concentrações de leitura. As amostras foram preparadas em triplicatas e realizadas varredura na faixa de 200 a 600 nm. .

Preparação das curvas de calibração

Posteriormente preparou-se curvas de calibração partindo-se de soluções estoque do padrão de LPSF/FZ4 (50 µg/mL). As amostras de LPSF/FZ4 foram analiticamente pesadas e solubilizadas nos diferentes solventes. Uma alíquota foi retirada dessas soluções para diluição da mesma maneira como descrito anteriormente, para a obtenção das seguintes concentrações: 0,2, 0,5, 1 e 2 µg/mL. As amostras foram preparadas em triplicatas e lidas no comprimento de onda de 246 nm.

CARACTERIZAÇÃO NO NÍVEL DE PARTÍCULAS

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

As curvas DSC foram obtidos em Calorímetro exploratório diferencial da Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, na faixa de temperatura de 25–300°C. As amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechados com 2 mg (± 0.2) de protótipo. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

Para a termogravimetria (TG) as análises foram por meio de termobalança, modelo TGA Q60 da marca Shimadzu®, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa da amostra de cerca de 3 mg (± 0.4) de LPSF/FZ4, acondicionadas em cadinho de alumina na faixa de temperatura de 25-600 °C na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. Oxalato de cálcio foi utilizado para calibrar a escala de temperatura e a perda de massa.

Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas do fármaco foram obtidos no difratômetro SIEMENS® (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo de 2 – 60 θ a uma velocidade de digitalização de 0,02° 2 θ /s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

CARACTERIZAÇÃO NO NÍVEL DE AGLOMERADOS

Morfologia e análise granulométrica

A avaliação da morfologia dos cristais de LPSF/FZ4 foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se um microscópio Jeol® JSM-5900, após serem fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec® SCD 050). As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 KV.

Foi utilizado um analisador de tamanho de partícula Microtac S3500, modelo de difração Fraunhofer, comprimento de onda do laser 780 nm para a análise granulométrica do protótipo a uma temperatura de atomização de 25°C com fluxo de ar 70 mL/h. As amostras

foram dispersas em água na razão de 1 mg/mL. Esta dispersão foi agitada no banho Ultrassônico Unique mod USC-1400^a, com potencia ultrassonica 135 Watts, durante 5 min antes de ser analisada. As análises foram realizadas em quintuplicada.

Área superficial

A medida da área superficial específica foi obtida por adsorção física de nitrogênio sobre pó material, pelo método Brunauer-Emmett-Teller(BET).

Para a realização do ensaio, foi utilizado um analisador de área superficial ASAP2440 micrometrics[®], munido do software para determinar a área superficial (S_{BET}). Foram pesados aproximadamente 200 mg das amostras as quais foram degaseificadas por 48h a 110°C para remover qualquer material adsorvido na superfície do material.

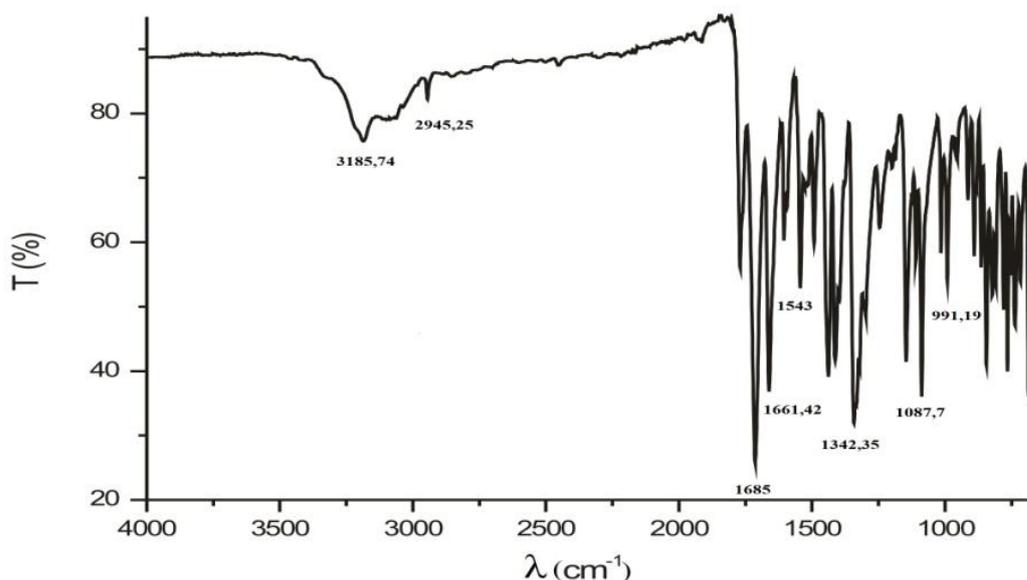
Foram analisadas as amostras do protótipo LPSF/FZ4 na temperatura de atomização de 160°C com fluxo de ar de 350 mL/h.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

O espectro na região IV do LPSF/FZ4 (Figura 3) apresenta picos característicos principalmente com relação às bandas típicas das amidas que representam o anel imidazólico presente na molécula, que são representadas pelas bandas devido às vibrações de deformação axial de C=O que absorve no comprimento de onda de 1685 cm^{-1} (banda de amida I), bem como uma banda de deformação angular N-H intensa em 1661 cm^{-1} (banda de amida II). Segundo dados na literatura, a presença do anel imidazolidinônico, confere, além da atividade anti-helmíntica, outras propriedades biológicas (OLIVEIRA et al., 2008).

Figura 3- Espectro de absorção na região do Infravermelho do LPSF/FZ4.



Além das bandas de deformação axial de C-H em 3185 cm^{-1} resultante de vibrações dos aromáticos presentes na molécula, somada às bandas de deformação angular fora do plano das ligações C-H dos anéis que aparecem em 991 cm^{-1} . A banda referente a 2945 cm^{-1} é relativa à deformação axial assimétrica e simétrica de C-H do metileno.

O grupo nitro é considerado parasitofórico devido a sua favorável contribuição para a atividade antiparasitária. Segundo Oliveira et al (2004), a presença deste grupo em derivados imidazolidina- 2,4-dionas conferiu melhor atividade esquistossomicida, como observado no LPSF/FZ4, portanto é fundamental a identificação de bandas no espectro de IV que caracterizarão a presença do grupo NO_2 .

Foi possível observar que as posições das bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de NO_2 ocorreram em 1543 cm^{-1} e 1342 cm^{-1} respectivamente. Devido às interações entre as frequências de deformação angular fora do plano de NO_2 e do C-H do anel. As bandas de baixa frequência são de pouca importância na identificação do padrão de substituição do anel. Encontramos ainda na região de 1087 cm^{-1} a vibração de deformação axial referente a ligação Cl-benzeno. O padrão de substituição dos anéis aromáticos são melhor evidenciados no espectro de RMN¹H, devido a posição dos deslocamentos dos hidrogênios dos mesmos, corroborando a posição *para*.

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

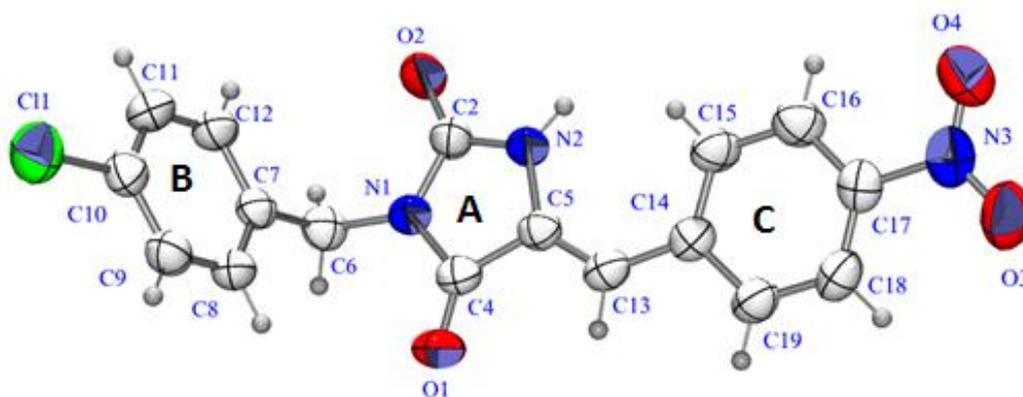
O espectro de RMN¹H do LPSF/FZ4 apresentou um singlete em δ 11, 229 provenientes do próton N-H do anel imidazolina. A presença do hidrogênio de alqueno da molécula foi confirmado pelo sigleto em δ 6,6. O hidrogênio de metileno apareceu em δ 4,6. Os hidrogênios dos aromáticos apresentaram deslocamentos químicos na faixa de δ 7,3 – 8,2 na forma de quatro dubletos, o que confirma a posição *para* dos seus substituintes: os prótons observados em campo baixo são referentes ao anel substituído com o grupo nitro devido ao seu efeito acentuado de desblindagem.

Apesar dos avanços nas técnicas espectrométricas empregadas na elucidação estrutural, notadamente em ressonância magnética nuclear, existem muitos casos em que a elucidação completa não se dá de maneira inequívoca. Dessa forma, a obtenção do monocristal do composto, passa a ser a etapa determinante da elucidação estrutural. Adicionalmente, a obtenção de monocristais se faz necessária também para a obtenção da estrutura tridimensional cristalina (CUNHA., 2008).

A difração de raios X de monocristais é o principal método para determinar a configuração absoluta de uma molécula e tais resultados fornecem parâmetros estruturais tridimensionais precisos e confiáveis (DESCHAMPS., 2010), podendo relacionar estruturalmente a atividade dos fármacos que são pré-requisitos para o projeto racional de medicamentos (BARREIRO., 1996).

A Figura 4 mostra a conformação cristalográfica do LPSF/FZ4 onde descreve a orientação relativa dos três fragmentos planares, o grupo imidazolínico (A), nitrobenzeno (B) e clorobenzeno (C), representando assim a identidade da molécula, pois apenas ela apresenta-se com essa seqüência de átomos ligados.

Figura 4- Representação ORTEP-3 da molécula do LPSF/FZ4.



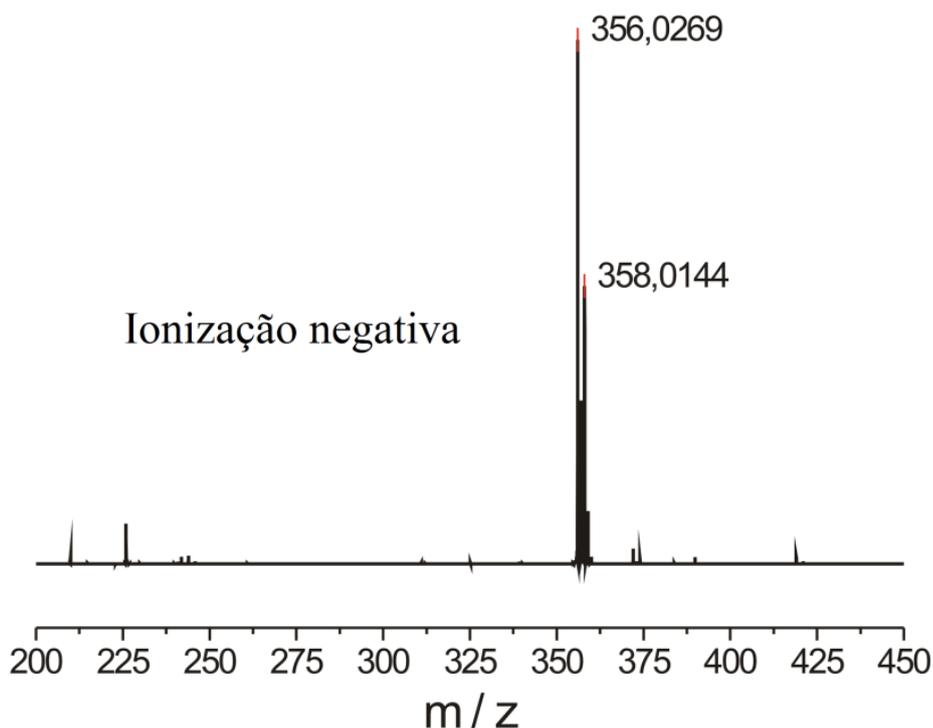
Espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV)

Uma vez que diferentes substâncias têm diferentes padrões de absorção, a espectrofotometria permite-nos, por exemplo, identificar substâncias com base no seu espectro. Para o LPSF/FZ4 a varredura espectrofotométrica por absorção ultravioleta mostrou absorção máxima em 346 nm no qual está relacionada com os tipos de ligações da espécie química. A absorção em 346 nm é atribuída a dois tipos de transições eletrônicas diferentes $n-\pi^*$ e $\pi-\pi^*$, correspondentes as carbonilas das amidas e a presença dos grupos funcionais insaturados, respectivamente. A soma destas absorções leva ao aparecimento de regiões de absorção no UV.

Espectrometria de massas (IT-TOF)

A Figura 5 mostra que o LPSF/FZ4 sofre ionização negativa, pois foi mais eficaz em evidenciar o real pico majoritário do protótipo, sendo observado com 100% da intensidade um pico característico em 356,0254 m/z, já que a massa molecular do LPSF/FZ4 é 357,06 g/mol, então $[M - 1] = 356,0254$ m/z.

Figura 5 – Espectro de massas do LPSF/FZ4



Solubilidade

Aplicando-se a equação $\varepsilon = \text{Abs} \cdot M^{-1}$, calculou-se a absorvidade molar do LPSF/FZ4 nos diferentes solventes. De acordo com Alves 2010, uma vez realizado o cálculo da absorvidade molar do fármaco, pode-se descobrir a concentração molar de qualquer amostra desconhecida solubilizada no solvente em questão. Sendo assim, escolheu-se a absorvidade molar em acetonitrila para o cálculo da solubilidade aquosa do LPSF/FZ4, uma vez que a acetonitrila mostrou-se ideal, apresentando alto poder de solubilização do protótipo e garantiu a estabilidade da solução.

O uso da absorvidade molar para a determinação da solubilidade demonstrou vantagens dentro do limite de confiabilidade analítica, mostrou que pode ser utilizada no setor de Desenvolvimento Analítico para facilitar o desenvolvimento de novos métodos, investigação de desvios de qualidade e/ou adaptação dos mesmos.

Os resultados obtidos (Tabela 1) fornecem informações importantes do comportamento do protótipo, possibilitando a escolha dos solventes mais adequados para a completa solubilização do LPSF/FZ4 e que permitam a máxima estabilidade da solução, proporcionando a quantificação adequada do mesmo.

Tabela 1- Resultados experimentais para o estudo de solubilidade quantitativo do LPSF/FZ4

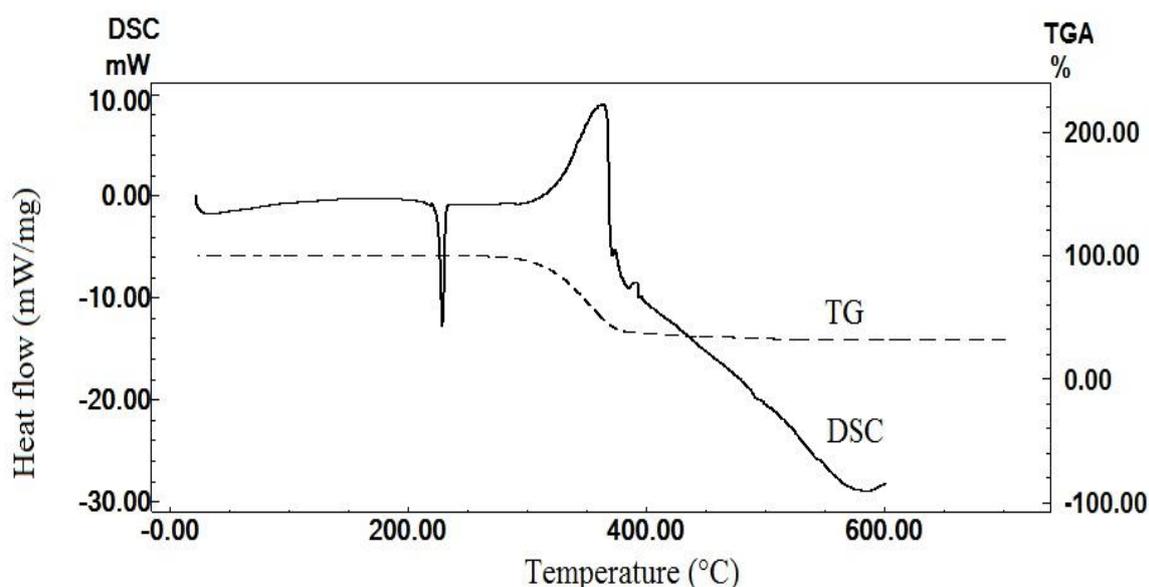
Solventes	Abs (média n3)	Conc Real (mg/mL)	E'
Etanol	0,121	1,76	29280,4
Metanol	0,073	1,17	25352,6
Acetonitrila	0,127	2,45	22449,5
Acetona	0,112	15,0	30887,3
Água	0,083	0,041	

Análise térmica

A curva DSC realizada para a verificação da faixa de fusão do LPSF/FZ4 (Figura 6) na razão de $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ evidenciou um pico endotérmico correspondente a temperatura de fusão em 230°C com um consumo de energia de $175 \pm 5 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ e um pico exotérmico em

362°C correspondente a degradação, que foi confirmado pela curva TG. O evidente e elevado ponto de fusão e elevada energia envolvida no processo, corrobora com o fato da estrutura do LPSF/FZ4 ser cristalina e seus retículos serem mantidos por fortes forças intermoleculares, como mostra a Figura 4. A curva TG apresentou uma única etapa de decomposição em um intervalo de temperatura entre 320°C e 370°C com 60% (± 3 %) de perda de massa, demonstrando um comportamento térmico estável.

Figura 6- Curvas TG e DSC do LPSF/FZ4 obtidas a 10°C/min, com massa de 3 mg, sob atmosfera de N₂ em fluxo de 50 mL/min.

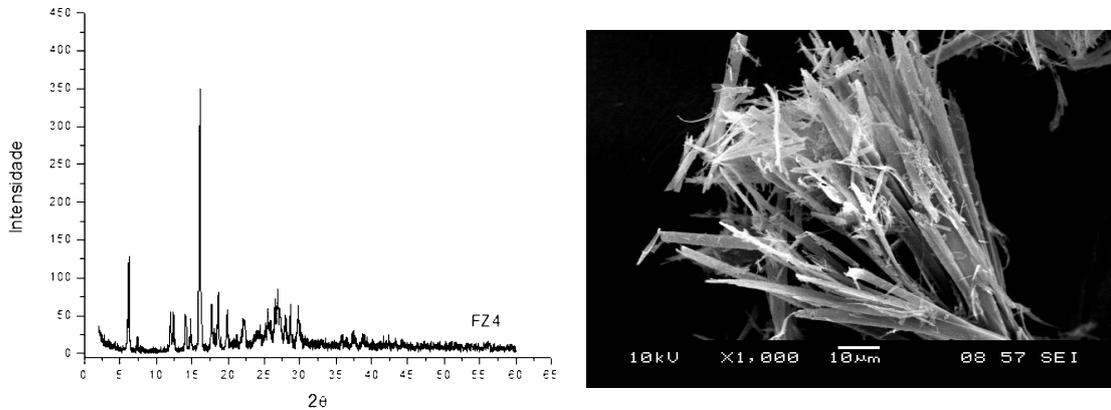


A pureza do LPSF/FZ4 foi calculada em triplicata através da aplicação da equação de Van't Hoff na linearização do evento de fusão, através do desvio da linearidade do mesmo, o qual ocorre pela presença de impurezas. Conhecendo-se o desvio da linearidade, pode-se inferir sobre o fator de correção na linearização da reta. Logo, a pureza do LPSF/FZ4 mostrou-se em torno de 98,22 %, com um fator de correção calculado para as impurezas de 17,12%.

Difração de raio X e MEV

O perfil difractométrico do fármaco revela a presença de dois picos de maior intensidade em 6,1 e 16,01° 2 θ , além de diversos picos secundários de menor intensidade em torno de 18,6 a 29,8°, evidenciando o comportamento cristalino do LPSF/FZ4. Tal comportamento também foi observado nas fotomicrografias obtidas pelo MEV (Figura 7), podendo-se observar a morfologia estrutural, onde as partículas se apresentaram sob forma de agulha, o que representa um estado cristalino do fármaco.

Figura 7- Difratoograma de Raios-X e MEV do LPSF/FZ4.

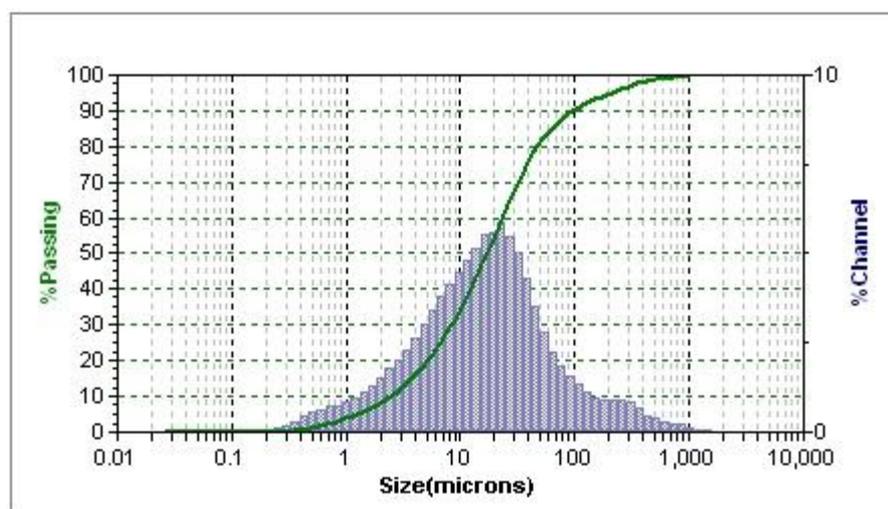


Diante do fato de que o formato cristalino do fármaco influencia na solubilidade e velocidade de dissolução (Nery et al., 2008) isso confirma que LPSF/FZ4 apresenta baixa solubilidade em água, o que justifica em Guedes e colaboradores 2008 a tentativa de aumentar a solubilidade e melhorar a biodisponibilidade com recursos técnicos, a formação de complexos de inclusão em ciclodextrina e a dispersão molecular de protótipos pouco solúveis.

Granulometria a laser e Área superficial específica

O gráfico de distribuição granulométrica do LPSF/FZ4 está apresentado na Figura 8, o mesmo permite determinar que a prevalência das partículas estão distribuídas no intervalo entre 10 e 100 μm e que 60% das partículas apresentaram tamanho médio de aproximadamente 63 μm . Portanto, de acordo com a Farmacopéia Brasileira, pode classificar a matéria-prima utilizada como um pó finíssimo (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Figura 8- Distribuição de frequência do tamanho das partículas de LPSF/FZ4.



A distribuição granulométrica dos insumos exerce influência importante em aspectos relacionados às etapas da produção industrial de um medicamento, como em processos de mistura e de enchimento, assim como em sua estabilidade e eficácia biológica (CURY et al., 2007).

No caso do LPSF/FZ4, depois de sintetizado o mesmo passa pelo processo de liofilização que controla o tamanho de partícula, tornando-a pequena ou finíssima, como mostrou a Figura 8, bem como resultou no aumento da área superficial que ficou em torno de 5.2277 m²/g, de acordo com a análise da medida de área superficial específica obtida por adsorção física de nitrogênio sobre o material, pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET).

Esse conhecimento se faz de extrema importância, visto que estes parâmetros físicos possuem influência direta na solubilidade, propriedades reológicas e, conseqüentemente na dissolução e biodisponibilidade de uma forma farmacêutica (GUIMARÃES et al., 2010).

Apesar disto, o protótipo não apresenta alta solubilidade aquosa, devido as suas propriedades químicas e estruturais, como mostra a Figura 9.

Figura 9- Interações de hidrogênio intermoleculares do LPSF/FZ4.



A conformação estrutural do LPSF/FZ4 apresenta fortes forças de atração interatômica, o que permite que as moléculas se arranjam de forma que os grupos

hidrofóbicos das moléculas permaneçam voltadas para fora da rede cristalina, diminuindo sua solubilidade em solventes com maior polaridade.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos da avaliação físico-química do LPSF/FZ4 frente a diferentes técnicas foram de fundamental importância, pois permitiu caracterizá-lo do ponto de vista morfológico e químico, fornecendo informações relevantes sobre a qualidade da matéria-prima. A caracterização baseada nos princípios do *Quality by design* detém informações importantes e permite o desenvolvimento de medicamentos de forma racional. A pesquisa com novas drogas é das que mais requerem cuidados no processo de avaliação, especialmente por que se desenvolvem em diferentes fases conforme o nível de conhecimento sobre aspectos de segurança e eficácia envolvidos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. C. P. A. **Novas imidazolidinas potencialmente ativas no combate à esquistossomose: síntese e avaliação da atividade no *Schistosoma mansoni***, 2002. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

ALENCAR, J. S.; BEDOR, D. C. G.; MEDEIROS, F.; ALENCAR, J. R. B.; LEITE, A. C. L.; BRONDANI, D. J.; GALEMBECK, A.; MACÊDO, R.; ALBUQUERQUE, M. M.; ROLIM NETO, P. J. Caracterização e Propriedades Térmicas do Ritonavir para Qualificação de Fornecedores. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, n. 2, p. 170-176, 2006.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANT' ANNA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 1-11, 1997.

CUNHA, S. Métodos simples de formação de monocristal de substância orgânica para estudo estrutural por difração de raios X. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 906-909, 2008.

CURY, B. S. F.; BUENO, J. H. F.; SILVA JUNIOR, N. P.; CASTRO A. D.; GREMIÃO, M. P. D. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 28, n. 1, p. 85-92, 2007.

DESCHAMPS, J. R. X-ray crystallography of chemical compounds. **Life Sciences**, Oxford, v. 86, n. 15-16, p. 585-589, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ªed. Brasília: FIOCRUZ editora, 2010, parte I.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Pharmaceutical Quality for the 21st Century a Risk-Based Approach Progress Report.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128080.htm>>. Acesso em: novembro de 2011.

GUEDES, F. L.; OLIVEIRA, B. G.; HERNANDES, M. Z.; SIMONE, C. A.; VEIGA, F. J. B.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; ROLIM NETO, P. J. Solid dispersions of imidazolidinedione by PEG and PVP polymers with potential antischistosomal activities. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 12, n. 1, p. 401-410, 2011.

GUIMARÃES, C. A.; MENAA, F.; MENAA, B.; QUENCA-GUILLEN, J. S.; MATOS, J. R.; MERCURI, L. P.; BRAZ, A. B.; ROSSETTI, F. C.; KEDOR-HACKMANN, É. R. M.; SANTORO, M. I. R. M. Comparative physical-chemical characterization of encapsulated lipid-based isotretinoin products assessed by particle size distribution and thermal behavior analyses. **Thermochim. Acta**, Amsterdam, v. 505, n. 1-2, p. 73-78, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Guidance for Industry Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria For New Drug Substances And New Drug Products: Chemical Substances.** maio 2000.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Guidance for Industry Q8(R2) Pharmaceutical Development.** nov, 2009.

LIMA, M. C. A.; COSTA, L. B.; GÓES, A. J. S.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; LUUDUC, C. Synthèse et activité antimicrobienne des chlorobenzyl benzyldène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. **Pharmazie**, Eschborn, v. 47, p. 182 – 184, 1992.

MAXIMINIANO, F. P; COSTA, G. H. Y; SOUZA, J. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Quim. Nova**, São Paulo v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

MONTRESOR, A. Cure rate is not a valid indicator for assessing drug efficacy and impact of preventive chemotherapy interventions against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. **Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg**, London, v. 105, n. 7, p. 361-363, 2011.

NERY, C.G.C.; PIRES, M.A.S.; PIANETTI, G.A.; VIANNA-SOARES, C.D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Brazilian J. of Pharm. Scien.**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 61-73, 2008.

OLIVEIRA, S. M.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidínicos. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 343-348, 2004.

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J. B. P.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de Hidantoínas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 614-622, 2008.

Capítulo III

5 ANÁLISE TÉRMICA

5.1 Artigo III – Estudo de compatibilidade do LPSF/FZ4 e cinética de decomposição térmica sob condições isotérmicas e não-isotérmicas

Artigo a ser submetido ao Journal of Thermal Analysis and Calorimetry

5.1 Artigo III – Estudo de compatibilidade do LPSF/FZ4 e cinética de decomposição térmica sob condições isotérmicas e não isotérmicas

RESUMO

Neste trabalho foram empregadas as técnicas de DSC e TG/DTG com o objetivo de determinar o comportamento térmico do LPSF/FZ4 isolado e associado com excipientes (amido, β CD, celulose, lactose, estearato de magnésio, aerosil, lauril sulfato de sódio, polissorbato e PVP) e métodos isotérmicos e não-isotérmicos foram realizados para a investigação dos parâmetros cinéticos de decomposição. Através do DSC e tomando como base a equação de Van't Hoff foi estabelecida uma pureza de 98% para o protótipo. O estudo cinético encontrou uma ordem de reação 1 com E_a 98,22 kJ mol⁻¹, o método isotérmico através da equação de Arrhenius permitiu o cálculo do tempo de estabilidade do LPSF/FZ4, quantificado em 4 meses. As misturas físicas 1:1 dos excipientes com o LPSF/FZ4 mostraram possíveis interações físicas e químicas do protótipo com PVP, polissorbato e lactose. Por outro lado, os resultados do IV não evidenciaram nenhuma modificação química na estrutura da molécula. Mesmo assim, como a curva TG do LPSF/FZ4 associado com a lactose evidenciou uma redução de mais de 40°C da estabilidade do protótipo, foi realizado a cinética de degradação. Tais resultados confirmaram a presença de interação entre o LPSF/FZ4 com a lactose, através da redução de aproximadamente 30% da E_a da reação de decomposição do protótipo mostrado em ambos os métodos cinéticos. O estudo mostrou a importância do uso de métodos termoanalíticos no estudo de caracterização de novos fármacos para a obtenção de parâmetros tecnológicos, possibilitando o desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Palavras chaves: LPSF/FZ4, análise térmica, cinética de degradação, estudo de compatibilidade.

INTRODUÇÃO

A análise térmica está entre as técnicas mais utilizadas (mais de 30 anos) para analisar substâncias de interesse farmacêutico e resolver e ou identificar problemas na área da tecnologia farmacêutica. Revelam informações importantes sobre as propriedades físicas dos materiais como: estabilidade, compatibilidade, polimorfismo, cinética de decomposição,

transição de fase, pureza etc (REZENDE; SANTORO; MATOS et al., 2008, CIDES et al., 2006, ARAÚJO et al., 2003).

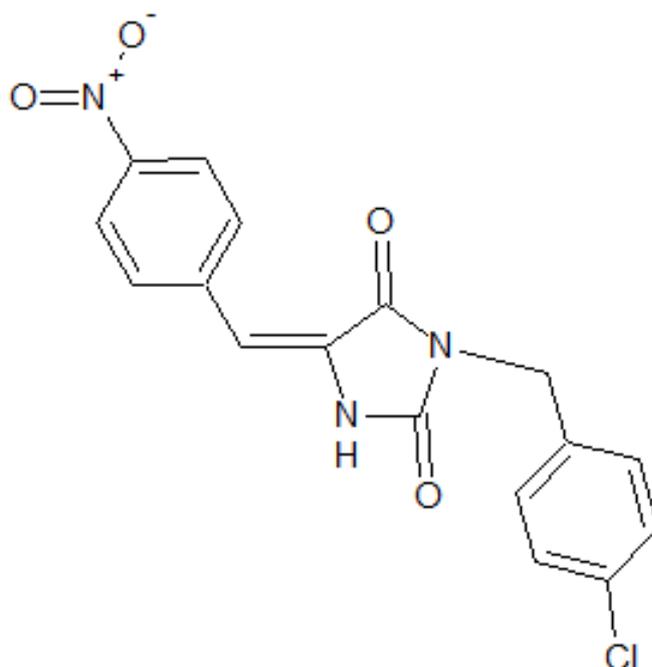
Estas técnicas permitem uma aquisição rápida de resultados e exigem relativamente simples condições experimentais, no entanto é aconselhável o uso de outras técnicas analíticas (IV, DRX, RMN, MEV, etc) para auxiliar na interpretação dos resultados termoanalíticos (TITA et al., 2011, SALVIO-NETO; NOVA'K; MATOS., 2009).

O estudo de compatibilidade fármaco excipiente representa uma importante etapa no estágio de préformulação para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica (PINTO et al., 2010). As interações físicas e químicas entre os ingredientes ativos e excipientes da formulação podem afetar as características químicas, estabilidade e biodisponibilidade do medicamento e, portanto, seu efeito terapêutico e eficácia. De fato, os métodos térmicos, possibilitam a detecção de interações físicas, bem como a formação de misturas eutéticas ou adsorção entre os compostos ativos e os excipientes, como por exemplo, na curva DSC pode-se observar possíveis interações de acordo com a mudança de aparência, ou o desaparecimento dos picos endotérmicos ou exotérmicos e ou variações nos valores de entalpia correspondente a mistura fármaco excipiente (TITA et al., 2011, BHARATE; BHARATE; BAJAJ., 2010).

Os estudos de cinética de degradação tornaram-se um ponto crucial em relação à análise térmica, onde o objetivo principal é determinar o mecanismo de reação de decomposição e os parâmetros da equação de Arrhenius (energia de ativação, fator de frequência e ordem de reação). Estes dados podem fornecer informações preciosas sobre as condições de armazenamento, especialmente tempo de vida útil, meia vida e vida de prateleira. O conhecimento de tais parâmetros faz parte das atividades de pesquisa durante o desenvolvimento de um novo produto farmacêutico (SOVIZI., 2010, TITA et al., 2009, TITA et al., 2008, OLIVA; LLABRÉS; FARIÑA et al., 2006).

Trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, sintetizaram o LPSF/ FZ4, com a finalidade de atuar como agente na terapia contra esquistossomose. O LPSF/FZ4 é um derivado imidazolidínico e sua atividade contra esquistossomose foi realizada por Oliveira et al (2004), mostrando -se o protótipo mais ativo dentre os fármacos do grupo de novas séries de imidazolidinas.

Figura 1- Fórmula estrutural do LPSF/FZ4



Sendo assim, por se tratar de uma molécula nova e pela pouca informação disponível na literatura, o objetivo deste estudo foi empregar TG/DTG e DSC para o estudo do comportamento térmico, compatibilidade com excipientes e cinética de decomposição do LPSF/FZ4 sob condições isotérmica e não-isotérmicas, afim de estabelecer padrões de comportamento para esse candidato a fármaco a ser veiculado em uma determinada forma farmacêutica.

EXPERIMENTAL

MATERIAL

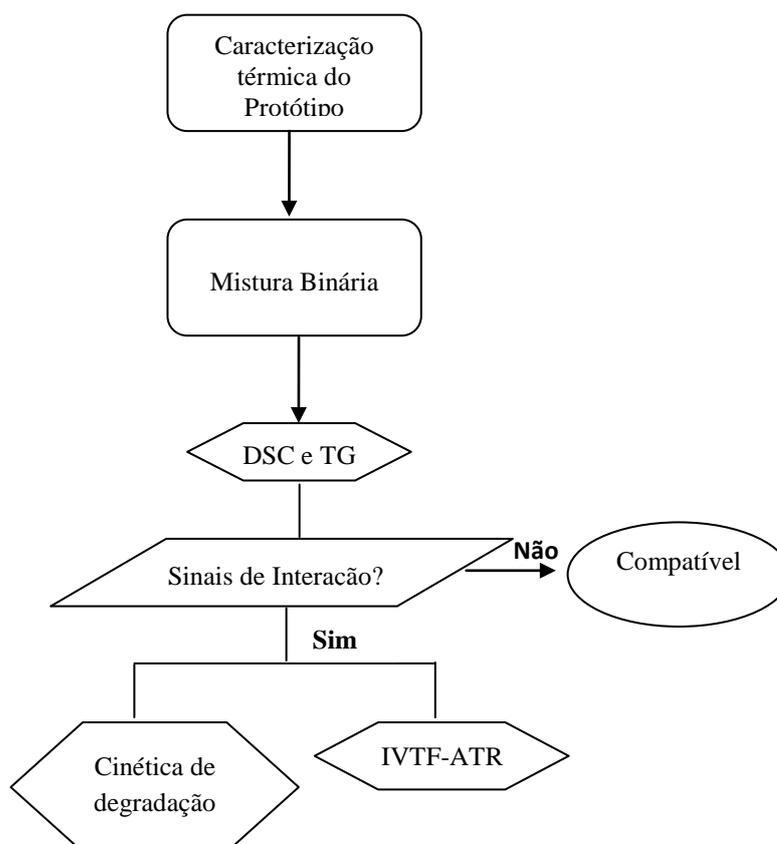
LPSF/FZ4 (Lot. 01), 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona, foi fornecido pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF) com pureza de 98% estimada por DSC (Calorimetria exploratória diferencial). Os excipientes usados foram Celulose microcristalina (CMC) (Blanver Farmoquímica Ltda[®]), Beta ciclodextrina (β CD) (Roquete[®]), Polivinilpirrolidona (PVP) (Xiamem[®]), Septrap 80 (Polissorbato) (Seppic[®]), Dióxido de silício coloidal (Aerosil) (Henkel[®]), Laurilsulfato de

sódio (LSS) (Nuclear®), amido (Colorcon®), estearato do magnésio (Ind. Química Anastácio S/A®), lactose (Pharma Nostra®).

MÉTODOS

O fluxograma (Figura 2) apresenta o protocolo utilizado para a avaliação da estabilidade térmica do LPSF/FZ4. Em primeiro lugar, medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG), somada a investigação da cinética de degradação térmica dinâmica e isotérmica foram realizadas para caracterização do protótipo, posteriormente para a análise da interação fármaco excipiente, misturas físicas binárias foram selecionadas para rápida interpretação. A investigação das possíveis interferências responsáveis pelas alterações no perfil térmico do composto foi procedida pela cinética de degradação e análise no Infravermelho.

Figura 2- Fluxograma para a avaliação da estabilidade térmica do LPSF/FZ4



As curvas de DSC para o fármaco foram obtidas por meio de um calorímetro da marca Shimadzu®, modelo DSC-60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras analisadas em torno de 2,0 mg (± 0.2), acondicionadas em cápsula de alumínio, na razão de 10°C/min, até a temperatura de 600°C. As determinações foram realizadas em triplicata. Realizou-se a calibração do DTA e do DSC via ponto de fusão do padrão Índio (156,6°C) e Zinco (419,6°C). O fluxo de calor e entalpia foram calibrados via ponto de fusão do Índio ($28,59 \pm 0,3 \text{ J.g}^{-1}$), sob as mesmas condições das amostras.

Termogravimetria (TG)

A caracterização termoanalítica através de TG foi realizada em triplicata por meio de termobalança, modelo TGA Q60 da marca Shimadzu®, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa da amostra de cerca de 3 mg ($\pm 0,4$) de LPSF/FZ4, acondicionadas em cadinho de alumina na faixa de temperatura de 25-600°C na razão de 10°C/min. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma ASTM E1582-93 (The American Society for Testing and Materials, 1993) (ARAÚJO et al., 2006, STORPITS et al., 2009, KLANCNIK et al., 2010).

Estudo cinético de decomposição

A investigação cinética de degradação não-isotérmica do LPSF/FZ4 foi obtida a partir dos dados de TG pela aplicação do método de Ozawa. Foram utilizadas razão de aquecimento 2,5, 5,0, 7,5, 10 e 12,5°C.min⁻¹, faixa de temperatura entre 30-600°C, em porta amostra de alumina com aproximadamente 2 mg de amostras e atmosfera dinâmica de nitrogênio em (50 mL.min⁻¹). Para o estudo cinético isotérmico, as curvas TG foram obtidas a partir do aquecimento das amostras até as temperaturas de 260, 270, 280, 290 e 300 °C, e mantidas em condições isotérmicas em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹) durante o tempo necessário para uma perda de massa de 10% $\pm 0,5$ em porta amostra de alumina com aproximadamente 6 mg de amostras.

Estudo de compatibilidade

Amostras de LPSF/FZ4 e cada excipiente foram individualmente pesados em quantidades iguais e colocados em recipientes de vidro âmbar para dar peso final de 60 mg. As misturas binárias 1:1 (LPSF/FZ4:excipiente) foram preparada na relação p/p através de

uma simples mistura. Foi adicionada 3 mg da mistura binária no porta-amostra de alumínio hermeticamente fechada do DSC e submetidas as mesmas condições já descritas.

Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

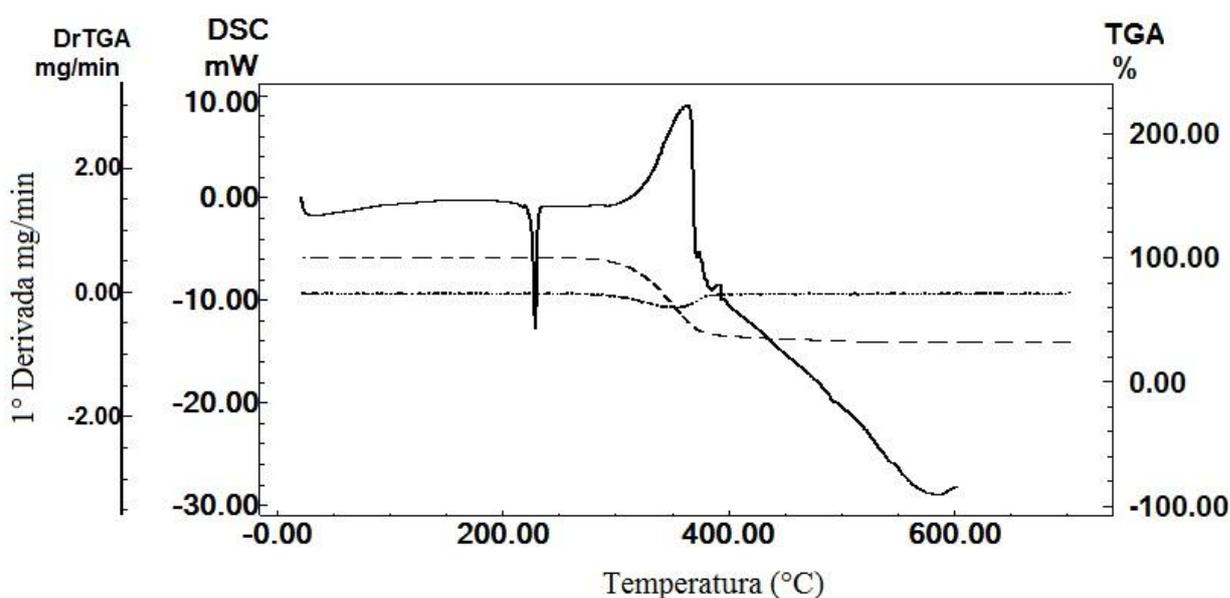
Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras do protótipo e das misturas fármaco-excipiente analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de 4000 a 650 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização termoanalítica

A curva DSC do LPSF/FZ4 mostrou um pico endotérmico correspondente ao evento do processo de fusão, na faixa de temperatura de 228°C a 234°C com um consumo de energia de -178 Jg^{-1} , seguido por processo de decomposição. O resultado foi confirmado pela análise de TG e pode ser melhor visualizado através da aplicação da primeira derivada (DTG), que o processo de decomposição térmica ocorre em uma fase na faixa de temperatura entre 323°C e 370°C, com perda de massa de 60,85% seguido por carbonização (Figura 3).

Figura 3- Curvas DSC e TG / DTG do LPSF/FZ4 obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

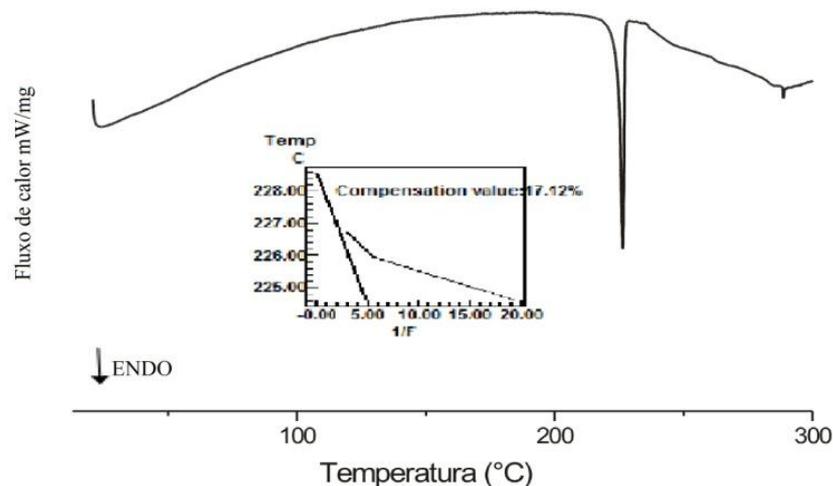


Determinação da pureza

Devido o LPSF/FZ4 ser até o momento um protótipo, e não possuir SQR (Substância Química de Referência) ou substâncias similares é importante à determinação da pureza e essa ferramenta é muito importante para os estudos de pré-formulação. A pureza foi determinada através do desvio da linearidade do evento de fusão, o qual ocorre pela presença de impurezas, calculada através da equação de Van't Hoff (ARAÚJO et al., 2010). Logo, a pureza média do LPSF/FZ4 por DSC mostrou-se em torno de 98,24%.

Na Figura 4 observa-se um gráfico denominado $1/F$ ($T \times 1/F$), que mostra a curva de temperatura de fusão *versus* o inverso da fração fundida, normalmente uma reta que permite a correção das áreas parciais. A inclinação da reta é proporcional ao teor de impurezas e a interseção com o eixo das ordenadas corresponde à temperatura do material puro (STORPITS et al., 2009). Neste caso, o LPSF/FZ4 funde em 229°C e apresenta um valor médio do teor de pureza já descrito acima.

Figura 4- Curva DSC obtida a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 de uma amostra de LPSF/FZ4 e gráfico de linearização de van't Hoff

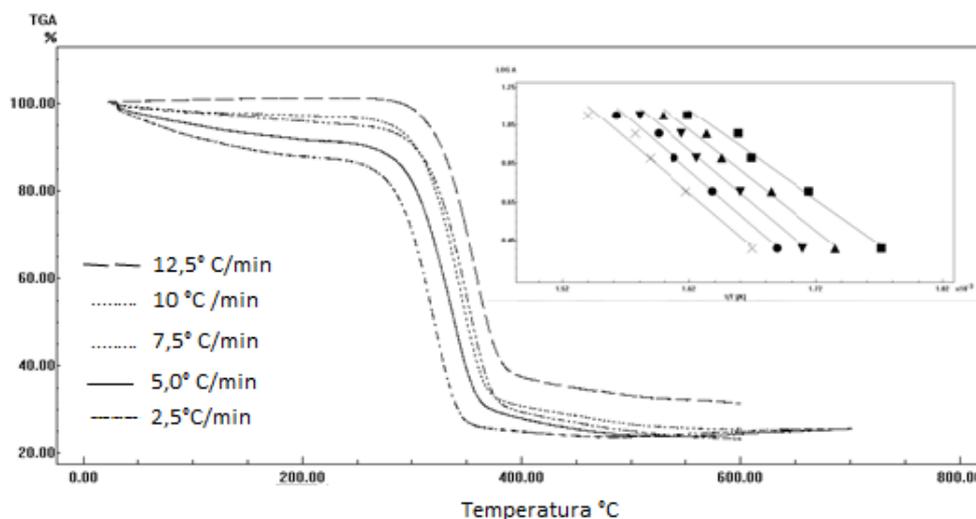


Estudo cinético de termodecomposição do LPSF/FZ4

Há duas maneiras de determinar os parâmetros cinéticos, uma utiliza o método convencional de estudo isotérmico por TG que através da equação de Arrhenius determina os parâmetros cinéticos e o estudo não-isotérmico que utiliza o método de Ozawa originado pela aproximação linear com base em cálculo integral da equação de Arrhenius (SALVIO-NETO; MATOS., 2011, SOVIZI., 2010).

Os dados cinéticos não-isotérmicos foram determinados pelo plotagem da perda de massa *versus* temperatura de cinco curvas TG em diferentes razões de aquecimento (Figura 5). Foi utilizado o método de Ozawa, o mesmo é baseado nos cálculos da integral a partir da equação da Arrhenius para obtenção dos parâmetros cinéticos no início da etapa de decomposição térmica em torno de 340-370° C do LPSF/ FZ4: E_a (energia de ativação) 98,22 kJ/mol, A (fator de frequência) $5,28 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$ e ordem de reação 1,0.

Figura 5- Curvas TG e o gráfico de Ozawa do LPSF/ FZ4 obtido em cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico.

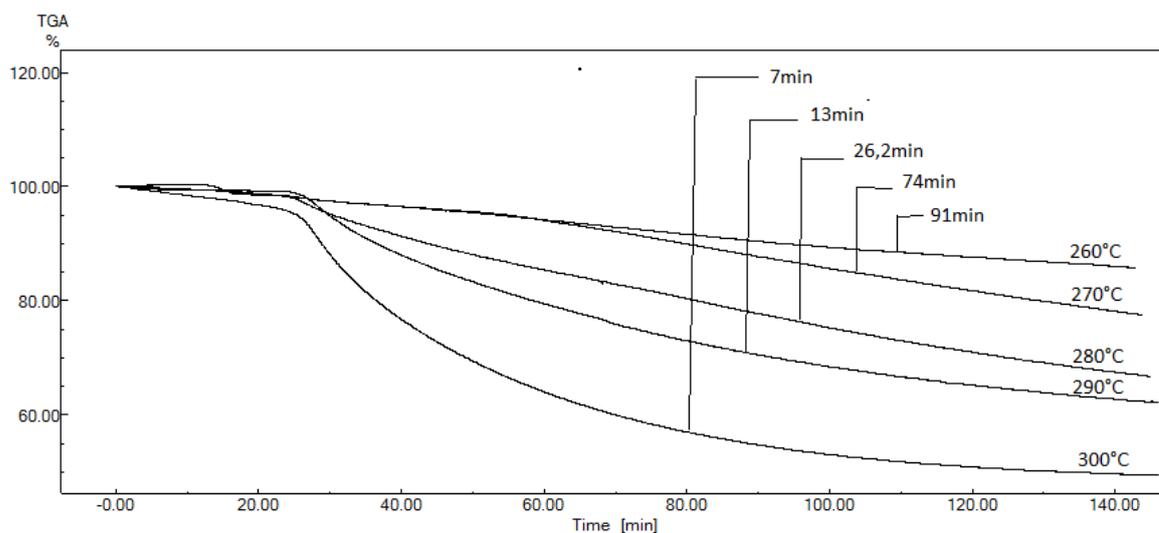


O gráfico de Ozawa demonstra uma boa correlação linear entre as cinco razões de aquecimento (FELIX; CIDES DA SILVA; MATOS., 2009). As cinco curvas TG indicam que a perda de massa entre 250°C e 400°C, ocorreu em uma única etapa, o que corrobora com a ordem de reação assumida de primeira ordem, uma vez que uma única reação contribui para a perda de massa, ou seja, há apenas uma reação significativa ocorrendo e não é afetado por processos concorrentes (HOWELL; RAY., 2006). Mostram também que as curvas de TG são deslocadas para maiores temperaturas, quando as razão de aquecimento aumentam. (BERTOL et al., 2010, CIDES et al., 2006)

O método isotérmico usa comumente a mesma razão de aquecimento e as temperaturas são mantidas constantes na região de interesse, ou melhor, antes do processo de decomposição, como mostra a curva TG/DTG (Figura 3) para monitorar a cinética da reação de decomposição térmica no estado sólido, portanto, o tempo de decomposição é estimado para um determinado intervalo de perda de massa (ALVES et al., 2010).

Os dados apresentados na Figura 6 mostram as isotermas utilizadas na determinação da energia de ativação do LPSF/ FZ4. Esta foi realizada aquecendo a amostra a 260, 270, 280, 290 e 300°C e mantidas constantes sob uma atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) por um tempo suficiente para a perda de massa em pelo menos 10%. Estas curvas mostram que quanto maior a temperatura, menor será o tempo necessário para a perda de massa.

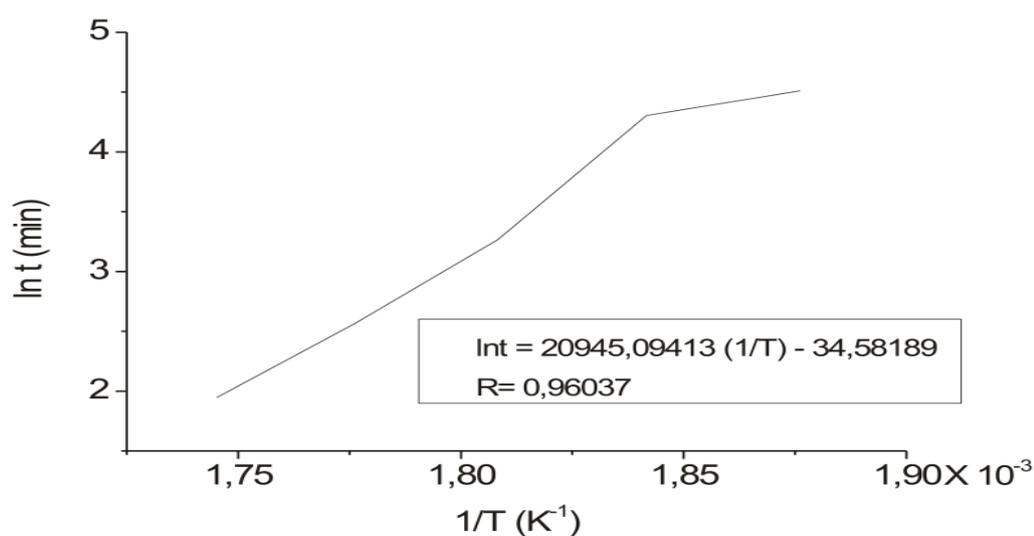
Figura 6- Curvas isotérmicas do LPSF/ FZ4 em diferentes temperaturas na atmosfera de N_2 ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)



Estas curvas foram utilizadas para obter o gráfico de $\ln t$ vs a recíproca da temperatura $1/T$ (K^{-1}) para o LPSF/FZ4 (Figura 7) também chamado de gráfico de Arrhenius, onde a equação da reta foi obtida por regressão linear ($y = ax + b$), para avaliar a validade do modelo cinético, mensurar a linearidade e o coeficiente de correlação (r) (RODRIGUES et al., 2005). O Valor da energia de ativação para o LPSF/FZ4 foi de $174,13 \text{ KJ mol}^{-1}$, calculada a partir do produto do coeficiente angular da inclinação da reta com a constante geral dos gases R ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

Calculou-se a estabilidade (em dias) com base na equação de Arrhenius, utilizando 25°C como padrão de temperatura ambiente. O resultado foi um tempo estimado de estabilidade térmica de 132 dias, ou seja, aproximadamente quatro meses para um decaimento de 10% de massa.

Figura 7- Gráfico de Arrhenius, $\ln t$ vs $1/T$, para a decomposição térmica das amostras de LPSF/FZ4.



Estudo de compatibilidade

O comportamento das misturas binárias mostraram pequenas mudanças na forma do pico com poucas variações da temperatura de fusão, indicando ausência de incompatibilidade na maioria dos casos. Os dados TG e DSC obtidos no estudo de compatibilidade estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Dados termoanalíticos do LPSF/FZ4 e das misturas binárias com excipientes

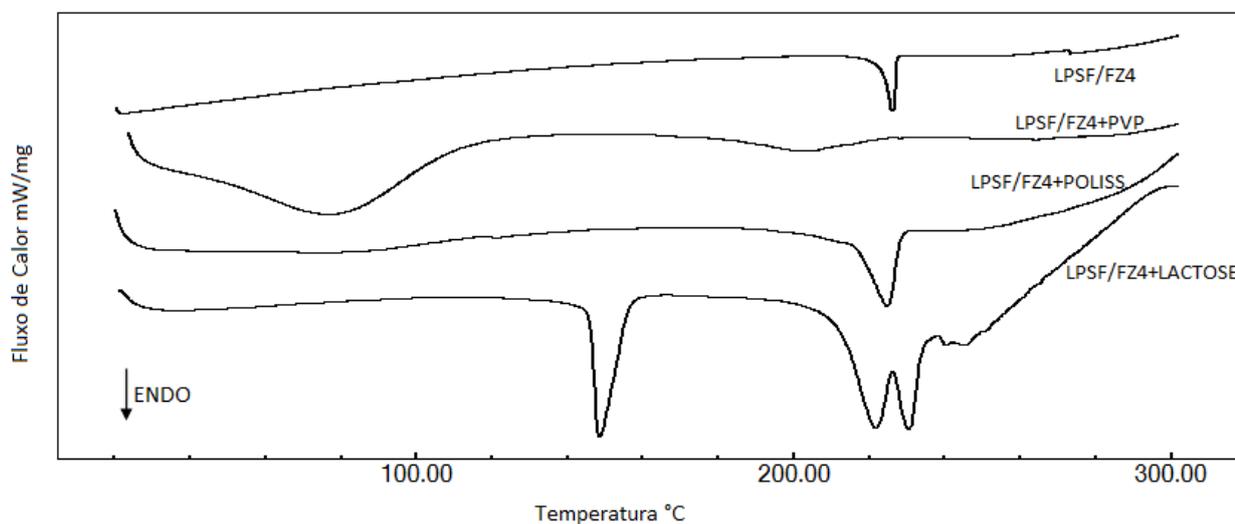
Amostra	T _{onset} /°c	T _{fusão} /°c	ΔH (J.g ⁻¹)	T _{onset} decomposição	% decomposição
LPSF/FZ4	228,4	231,8	-178,0	323,5	60,8
LPSF/FZ4+Amido	225,4	229,2	-53,4	291,4	49,2
LPSF/FZ4+Aerosil	220,8	227,1	-29,4	317,4	25,1
LPSF/FZ4+βCD	226,6	229,6	-61,5	315,8	43,2
LPSF/FZ4+Celulose	225,4	228,9	-69,6	332,2	25,4/32,9
LPSF/FZ4+Estearato	223,1	229,5	-115,8	300,2	19,0/29,1
LPSF/FZ4+LSS	221,5	226,2	-88,9	327,7	24,4
LPSF/FZ4+Lactose	226,4	230,5	-26,0	282,0	18,7/15,5

LPSF/FZ4+Polissorbato	217,4	224,7	-44,6	313,9	25,6
LPSF/FZ4+PVP	-	-	-	321,7	16,0/35,8

Para a mistura binária LPSF/FZ4:PVP ocorreu o desaparecimento do ponto de fusão do protótipo (Figura 8), isso é indicativo de uma forte interação, em virtude do aquecimento, mas não necessariamente correspondente a incompatibilidade. O comportamento da mistura evidencia a miscibilidade do protótipo no PVP fundido ocorrendo total solubilização do LSPF/FZ4, representada por um pico alargado e de baixa intensidade, devido a grande variação dos pontos de fusão individuais.

Na curva DSC da mistura binária de LPSF/FZ4:Polissorbato (Figura 8), houve uma redução considerável da temperatura de fusão de mais de 10°C do início da temperatura de fusão do protótipo, que pode ser indicativo de ocorrência de interação fármaco-excipiente. De acordo com as curvas TG/DTG (Figura 9) o início da temperatura de decomposição diminuiu de 323 para 313°C.

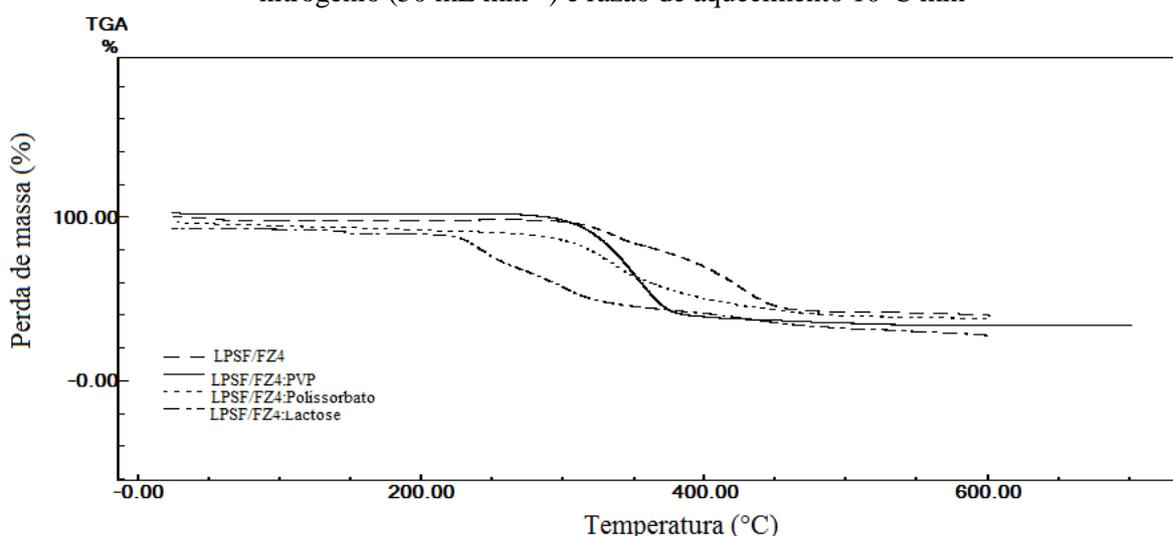
Figura 8- Curvas DSC do LPSF/FZ4 e excipientes obtidos em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 10°C min⁻¹



A curva DSC da lactose mostra um pico endotérmico em 145°C correspondente à perda de água, pico exotérmico em 173°C referente a transição cristalina, e um evento endotérmico em 215°C correspondente ao ponto de fusão, e logo seguida a decomposição térmica (CIDES et al., 2006). Na mistura LPSF/FZ4:Lactose, observou-se um leve retardo do início da temperatura de fusão do protótipo, no entanto a curva TG da mistura binária (figura

8) revelou interações entre o protótipo e a lactose, que pode ser de natureza física. Este fato é justificado porque a curva TG (Figura 9) mostrou a antecipação da temperatura de decomposição térmica em torno de 40 ° C abaixo da degradação do prototipo. Tais resultados também podem ser observados em outras aminas e amidas como glimepirida, primaquina, glipzida e glibenclamida (SALVIO-NETO; MATOS., 2011; BERTOL et al., 2010; CIDES et al., 2006).

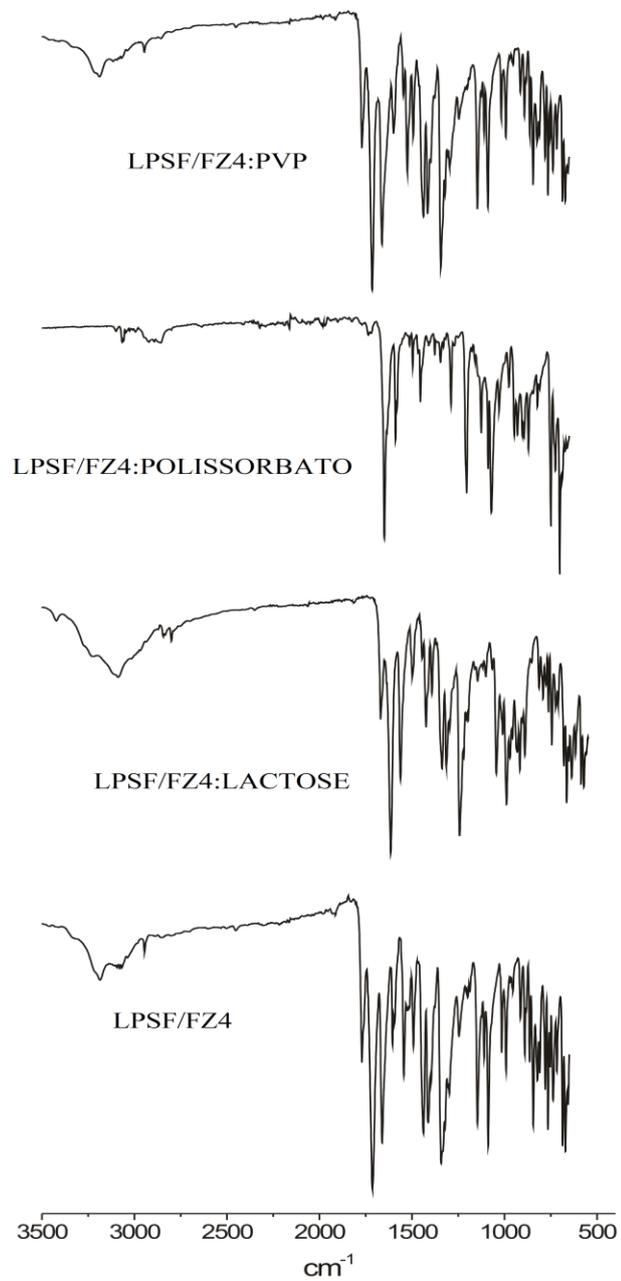
Figura 9- Curvas TG das misturas físicas fármaco excipientes obtidos em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento $10^\circ\text{C min}^{-1}$



O espectro na região do IV foi usado como técnica suplementar de ordem investigativa das possíveis interações químicas entre o protótipo e os excipientes e para confirmar os resultados obtidos pela análise térmica.

A Figura 10 mostra os espectros IV do LPSF/FZ4 e da mistura física LPSF/FZ4:Polissorbato, a mesma mostra a presença de bandas características correspondentes ao protótipo e ao excipiente. Não ocorreu aparecimento e desaparecimento de novas bandas, nem alteração na intensidade das bandas no espectro, confirmando nenhuma mudança na estrutura do protótipo (TITA et al., 2011). Resultado similar também pode ser observado para a mistura física LPSF/FZ4:Lactose.

Figura 10- Espectro na região do IV das misturas físicas 1:1 LPSF/FZ4 com Lactose, PVP e Polissorbato



As Figuras 11 e 12 mostram as curvas TG da cinética de decomposição sob condições isotérmicas da degradação do LPSF/FZ4 associado com a lactose. As amostras foram mantidas em 200, 205, 210, 215 e 220°C para 10% de perda de massa, representado na Figura 11 a correlação entre a perda de massa e temperatura, bem como, com os dados do experimento e a partir do método de regressão linear, foi construído o gráfico de Arrhenius (Figura 12).

Figura 11- Curvas isotérmicas da mistura física 1:1 entre LPSF/ FZ4 e lactose em diferentes temperaturas na atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹).

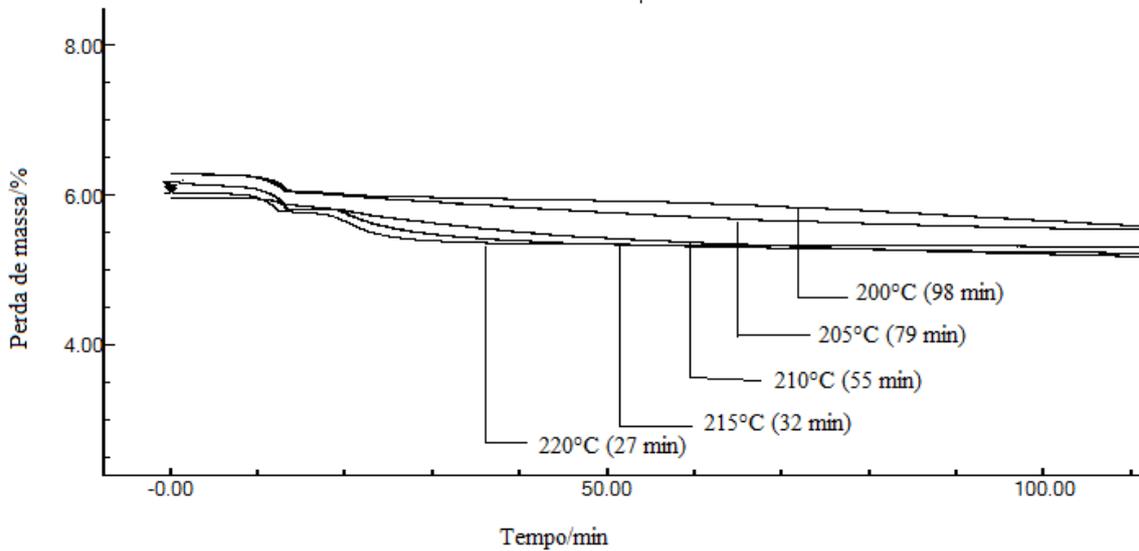
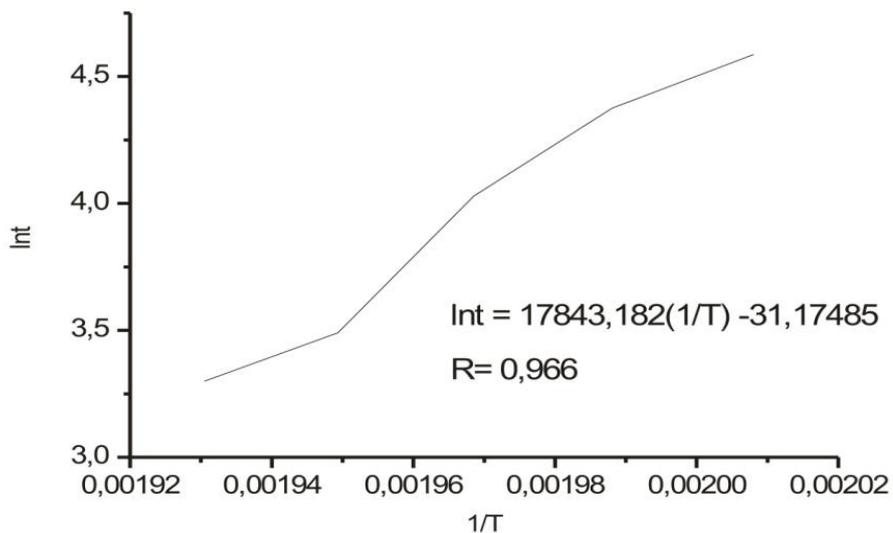


Figura 12 - Gráfico de Arrhenius, $\ln t$ vs $1/T$, para a decomposição da mistura física 1:1 entre LPSF/FZ4 e lactose



A superposição das curvas TG obtidas em diferentes razões de aquecimento (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5°C/min) para a cinético de decomposição sob condições não isotermicas (método de Ozawa) para a degradação do LPSF/FZ4 e lactose são mostradas na Figura 13. A Tabela 2 lista os valores dos parâmetros cinéticos obtidos pelo estudo não-isotérmico e a energia de ativação (Ea) e o coeficiente de correlação (r) obtidos pelo estudo isotérmico.

Figura 13 - Curvas TG e o gráfico de Ozawa da mistura física 1:1 entre LPSF/FZ4 e lactose obtido em cinco razões de aquecimento sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico

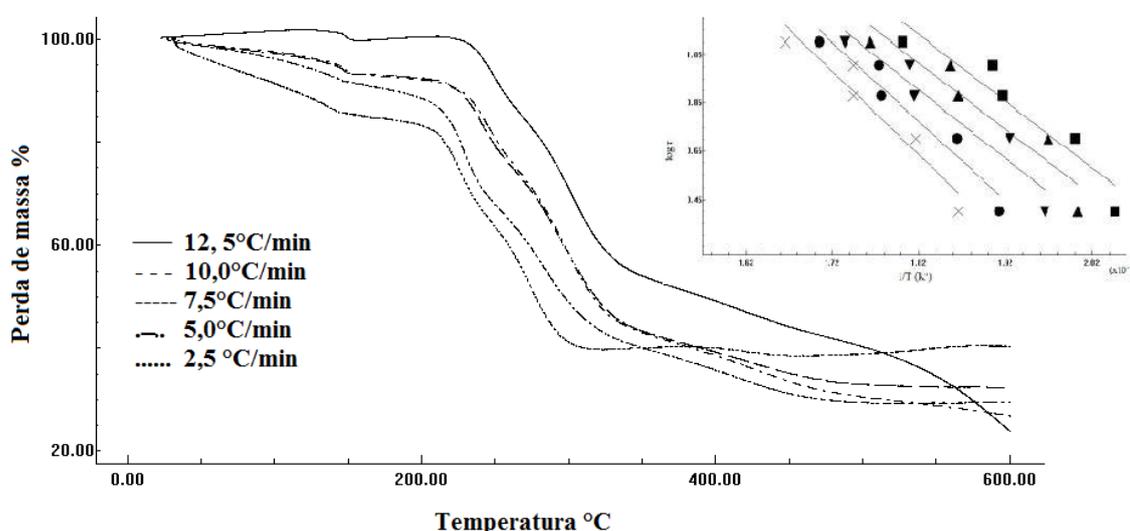


Tabela 2- Parâmetros cinéticos obtidos pelo método não-isotérmico e energia de ativação (Ea) e o coeficiente de correlação (r) obtidos pelo estudo isotérmico.

Amostra	Não-isotermica			Isotérmica	
	Ea/kJmol ⁻¹	A/min ⁻¹	Ordem	Ea/kJmol ⁻¹	r
LPSF/FZ4	98,22	5,28x10 ⁷	1,0	174,13	0,96037
LPSF/FZ4:LACTOSE	54,95	2,49x10 ⁴	1,2	148,34	

Foi observado uma redução na Ea obtida pelo método de Ozawa do protótipo associado com a lactose (54,95 kJ mol⁻¹) quando comparado ao protótipo sozinho (98,22 kJ mol⁻¹), da mesma forma também pôde-se observar para o estudo isotérmico (174,13 – 148,34 kJ mol⁻¹), representando aproximadamente uma diferença de 30% na energia de ativação. Esses resultados confirmam a baixa estabilidade do protótipo na presença da lactose

corroborando com os resultados obtidos no estudo de compatibilidade por análise térmica e espectroscopia na região do IV (SALVIO-NETO; MATOS., 2011).

CONCLUSÃO

O estudo do comportamento térmico por técnicas termoanalíticas empregadas no presente trabalho permitiu fornecer informações detalhadas sobre uma nova entidade química mesmo em estágios mais iniciais da descoberta quando da identificação até o desenvolvimento de uma formulação. A calorimetria exploratória diferencial permitiu identificar o LPSF/FZ4 através de sua faixa e entalpia de fusão, fornecendo ainda dados quantitativos sobre sua pureza.

A comparação entre os métodos isotérmico e não isotérmico mostrou uma boa concordância para os valores dos parâmetros cinéticos (energia de ativação) demonstrando alta estabilidade térmica do protótipo. A decomposição cinética ocorreu em velocidade constante, ordem um (uma única reação que contribui para a perda de massa), ou seja, há apenas uma reação significativa ocorrendo e não é afetado por processos concorrentes.

O resultados do estudo de compatibilidade de algumas misturas binárias foram estudados usando TG / DTG, DSC, IV e cinética de decomposição. Os resultados mostraram a utilidade da análise térmica como um método rápido e conveniente na realização de uma triagem de candidatos a excipiente durante os estudos de preformulação, porque permitiu a demonstração de interações ou incompatibilidade fármaco-excipiente. Nestes estudos, foi observado possível interação do LPSF/FZ4 com a lactose, confirmada através do estudos cinéticos (isotérmico e não-isotérmico) que indicaram uma diminuição de aproximadamente 30% do valor da energia de ativação da degradação do protótipo puro e associado com a lactose, mostrando uma diminuição na estabilidade da fármaco.

Sendo assim, o presente estudo contribuiu para a seleção de excipientes apropriados para o desenvolvimento de uma formulação segura e estável, mostrando através dos resultados da compoatibilidade e das cinéticas que a associação do LPSF/FZ4 com a lactose não é recomendado para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida.

Desta forma a utilização da análise térmica traduz uma alternativa de indubitável interesse no campo farmacêutico com o objetivo de prever rapidamente e com baixo custo a estabilidade a longo prazo de um candidato a insumo farmacêutico e acelerar a sua comercialização.

REFERÊNCIAS

ALVES, R.; REIS, T. V. S.; CIDES DA SILVA, L. C.; STORPITIS, S.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R. Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 343-351, 2010.

ARAÚJO, A. A. S.; STORPITIS, S.; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M. S.; SANTOS FILHO, M.; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v. 260, n. 2, p. 303–314, 2003.

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPITIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, É. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas – DSC. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BERTOL, C. D.; CRUZ, A. P.; STULZEH, K. R.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p.187-192, 2010.

BHARATE, S. S.; BHARATE, S. B.; BAJAJ, A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. **J. Excipients and Food Chem.**, Arlington, v. 1, n. 3, p. 3-26, 2010.

CIDES, L. C. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS FILHO, M.; MATOS, J. R. Thermal behavior, compatibility study and decomposition kinetic of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.

FELIX, F. S.; SILVA, L. C. C.; ANGNES, L. MATOS, J. R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 95, n. 3, p. 877-880, 2009.

HOWELL, B. A.; Ray, J. A. Comparison of isothermal and dynamic methods for the determination of activation energy by thermogravimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 83, n. 1, p. 63–66, 2006.

KLANCNIK, G.; MEDVED, J.; MRVAR, P. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation. **RMZ – Materials and Geoenvironment**, Ljubljana, v. 57, n. 1, p. 127–142, 2010.

LEMOS, A. B. Generalidades da análise térmica. **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens –ITAL**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 1-4, 2003.

MAMEDE, L. C.; CAETANO, B. L.; ROCHA, L. A.; FERREIRA, E. M.; CESTARI, A.; KFURI, C. R.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S.; MELLO, C.; CUNHA, W. R.; NASSAR, E. J. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 27, n. 2, p. 151-155, 2006.

OLIVA, A.; LLABRÉS, M.; FARIÑA, J. B. Data analysis of kinetic modeling used in drug stability studies: isothermal Versus Nonisothermal assays. **Pharmaceutical research**, New York, v. 23, n. 11, p. 2595-2602, 2006.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; SOARES, C. D. V.; PIANETTI, G. A. Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1653-1657, 2010.

OLIVEIRA, S. M.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidínicos. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 343-348, 2004.

PINTO, M. F.; MOURA, E. A.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O. Thermal compatibility studies of nitroimidazoles and excipients. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 102, n. 1, p. 323–329, 2010.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

SALVIO-NETO, H.; NOVA'K, C. S.; MATOS, J. R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 97, n. 1, p. 367–374, 2009.

SALVIO NETO, H.; MATOS, J. R. Compatibility and decomposition kinetics studies of prednicarbate alone and associated with glyceryl stearate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 103, n. 1, p. 393-399, 2011.

SCHNITZLER, E.; LENÇONE, K.; KOBELNIK, M. Caracterização de fármacos por análise térmica. **UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**, Ponta Grossa, v. 8, n. 1, p. 91-100, 2002.

SOVIZI, M. R. Thermal behavior of drugs. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. **J. Therm. Calorim.**, v. 102, n. 1, p. 285- 289, 2010.

STORPITIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 32-65, 352 p.

TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TITA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 221-227, 2011.

TITA, B.; FULIAS, A.; MARIAN, E.; TITA, D. Thermal stability and decomposition kinetics under non-isothermal conditions of sodium diclofenac. **Rev. Chim.**, Bucharest, v. 60, n. 5, p. 524-528, 2009.

TITA, B.; MARIAN, E.; TITA, D.; VLASE, G.; DOCA, N.; VLASE, T. Comparative kinetic study of decomposition of some diazepam derivatives under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 94, n. 2, p. 447-452, 2008.

VIANA, O. S.; ARAUJO, A. A. S.; SIMOES, R. A.; SOARES, J. L.; MATOS, C. R. S.; GRANGEIRO JUNIOR, S. C.; LIMA, M.; ROLIM NETO, P. J. Kinetic Analysis of the Thermal decomposition of Efavirenz and Compatibility Studies with Selected Excipients. **Lat. Am. J. Pharm.**, Buenos Aires, v. 27, n. 2, p. 211-6, 2008.

VYAZOVKIN, S. Thermal Analysis. **Anal. Chem.**, Washington, v. 78, n. 12, p. 3875-3886, 2006.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Pode-se afirmar que de acordo com os resultados obtidos com este trabalho, o estudo de pré-formulação para o LPSF/FZ4 foi considerado significativo para a caracterização do mesmo, uma vez que permitiu caracterizá-lo do ponto de vista físico e químico frente a diferentes técnicas e métodos.

Os estudos térmicos realizados foram capazes de delinear a estabilidade deste protótipo apresentando-se estável por 4 meses sob temperatura ambiente com decaimento de 10% de massa, bem como evidenciar possíveis interações químicas entre o LSPF/FZ4 com a lactose e o polissorbato. A compreensão destas informações pode levar à concepção de uma formulação para o LPSF/FZ4.

É de grande importância que instituições públicas de ensino e pesquisa como a Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, através do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM em parceria com o Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos- LPSF unam esforços em busca de alternativas terapêuticas ao combate da Esquistossomose, integrando diferentes etapas da PD&I de medicamentos, desde a obtenção de candidatos a fármacos ao estudo de preformulação, reduzindo dessa forma o longo caminho que o protótipo deve percorrer antes de chegar ao mercado.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

- Aprofundar e aperfeiçoar o estudo termoanalítico, bem como a compatibilidade entre o protótipo e excipientes, utilizando técnicas complementares;
- Realizar estudo de estabilidade em condições forçadas do protótipo; com a finalidade de estabelecer a estabilidade da molécula
- Realizar estudos de estresse com o protótipo e possíveis excipientes a serem utilizados numa formulação;
- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar simultaneamente o LPSF/FZ4 e seus produtos de degradação;

Referências

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª edição; 2005.
- FREZZA, T. F.; MADI, R. R.; BANIN, T. M.; PINTO, M. C.; SOUZA, A. L. R.; GREMIÃO, M. P. D.; ALLEGRETTI, S. M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 28, n. 2, p. 209-214, 2007.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Pharmaceutical Development**, Q8(R2),(CHMP/ICH/167068/04), 2009.
- LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.
- MAMEDE, L. C.; CAETANO, B. L.; ROCHA, L. A.; FERREIRA, E. M.; CESTARI, A.; KFURI, C. R.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S.; MELLO, C.; CUNHA, W. R.; NASSAR, E. J. Comportamento térmico de alguns fármacos e medicamentos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 27, n. 2, p. 151-155, 2006.
- OLIVA, A.; LLABRÉS, M.; FARIÑA, J. B. Data Analysis of Kinetic Modelling Used in Drug Stability Studies: Isothermal Versus Nonisothermal Assays. **Pharmaceutical research**, New York, v. 23, n. 11, p. 2595–2602, 2006.
- OLIVEIRA, S. M.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidínicos. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 343-348, 2004.
- RATHORE, A. S.; WINKLE, H. Quality by design for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, n. 1, p. 26–34, 2009.
- RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Application of TA and kinetic study to compatibility and stability problems in some commercial drugs. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 66, n. 1, p. 155-178, 2001.
- SILVA, F. P. S.; SOARES, J. S.; ROLIM, L. A.; LYRA, M. A. M.; SILVA K. E. R.; SILVA, M. R. F.; ROLIM NETO, P. J. Pharmaceutical development of paracetamol oral suspension. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 30, n. 8, p. 1550-1554, 2011.
- SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES, M. F. R.; LOPES, P. Q.; CORREIA, L. P.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O.; ROLIM-NETO, P. J. A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 11, n. 3, p. 1391-1396, 2010.

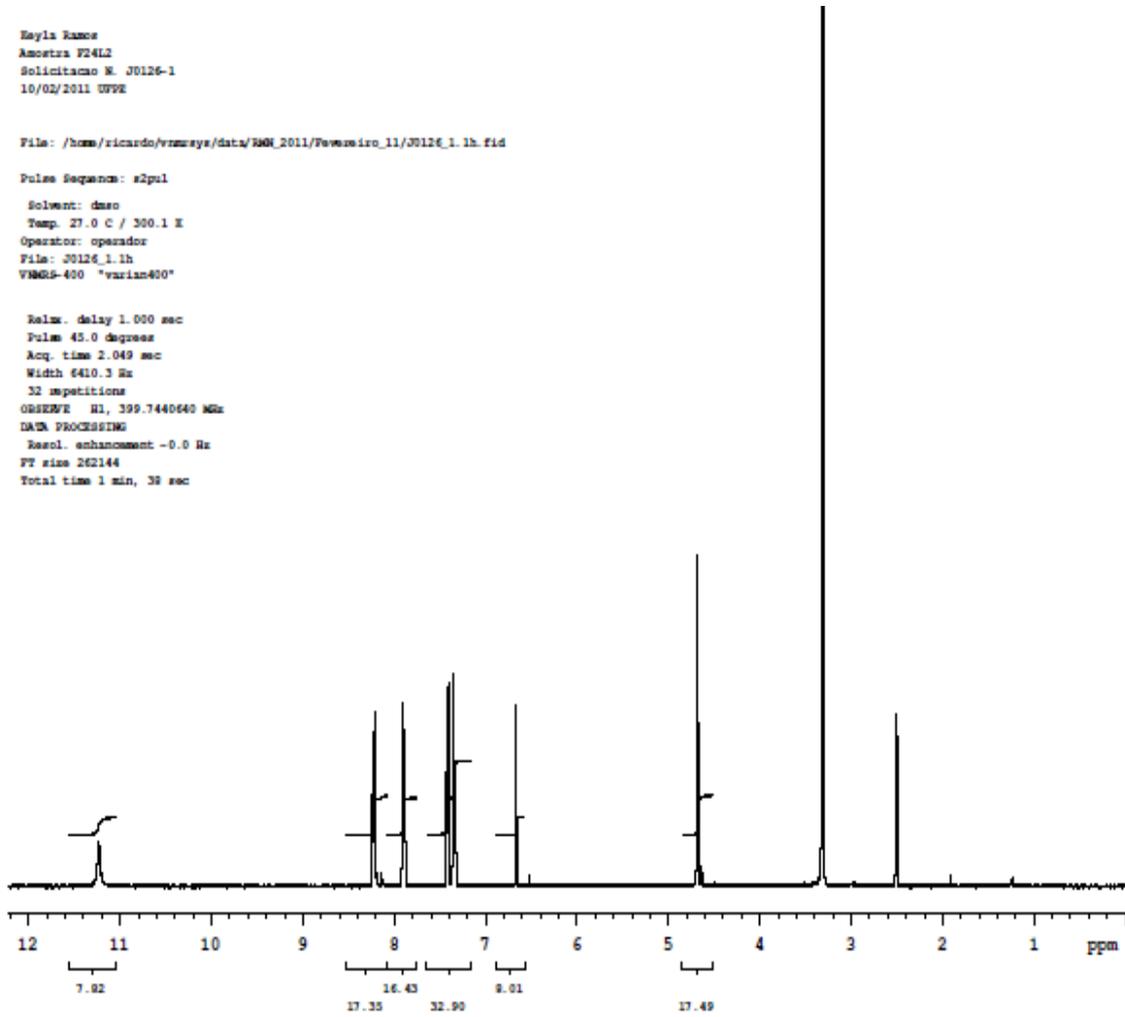
SOVIZI, M. R. Thermal behavior of drugs. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. **J. Therm. Calorim.**, v. 102, n. 1, p. 285- 289, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programmes and projects, Schistosomiasis**. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em: 26 dec. 2011.

WHO (World Health Organization). **TDR and product/drug Discovery, Schistosomiasis**. 2011. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/schistosomiasis>>. Acesso em: 26 dec. 2011.

Apêndice

APÊNDICE A – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear



Anexo

ANEXO A - Aceite do artigo intitulado: ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS NO COMBATE A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA na Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 17 de maio de 2011

Ref. RCFBA-001/2011

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo:

Título: "Alternativas terapêuticas no combate a Esquistossomose Mansônica"

Autores: Keyla Emanuelle Ramos da Silva, Rosali Maria Ferreira da Silva, Salviana Priscilla Manso Costa, Larissa Araújo Rolim, Maria do Carmo Alves de Lima, Pedro José Rolim Neto.

foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,

Eliana Aparecida Varanda
Editora Chefe
