UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas de doseamento da nova entidade química 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4)

Keyla Emanuelle Ramos da Silva

Recife
2012

KEYLA EMANUELLE RAMOS DA SILVA

Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas de doseamento da nova entidade química 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
Co-orientadora: Profª Drª Maria do Carmo Alves de Lima

Recife
2012

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Keyla Emanuelle Ramos da

Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas de doseamento da nova entidade química 3-(4-cloro-benzil)-5-(4- nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4)/ Keyla Emanuelle Ramos da Silva– Recife: O Autor, 2012.

134 folhas : il., fig., tab.
Orientadora: Pedro José Rolim Neto
Coorientadora: Maria do Carmo Alves Lima
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia

1.Farmacologia 2. Esquistossomose 3. Imidazolidina I. Rolim Neto, Pedro José (orientador) II. Lima, Maria do Carmo Alves (coorientadora) III. Título

615.1 CDD (22.ed.) UFPE/CCB- 2013- 051

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 07 de dezembro de 2012.

Tese de Doutorada defendida e **APROVADA**, por decisão unanime, em 07 de dezsembro de 2012, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof° Dr° Maria do Carmo Alves de Lima
(Departamento de Antibióticos da Universidade de Pernambuco)

Assinatura_____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof° Dr° Antonio Rodolfo Farias
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura_____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof° Dr° Miracy Muniz de Albuquerque
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura_____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof° Dr° Rosali Maria Ferreira da Silva
(Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará)

Assinatura_____

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof° Dr° Fabio Santos de Souza
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade federal da Paraíba)

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 BIOLÓGICAS
Profª. Drª. Ângela Maria Isidro Farias

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Profª. Drª. Silvia Regina Arruda de Moraes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
Profª. Drª. Suely Lins Galdino

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

A minha Mãe e a meu Irmão, os amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe **Zélia Ramos de Sousa**, que é o que tenho de mais precioso, pelos ensinamentos, incentivo, confiança, amor e carinho dedicado a mim sempre.

A **minha família**, por estarem comigo sempre, pelas palavras de incentivo em todos os momentos. Em especial ao **meu irmão, Ramon Ramos,** pelo seu coração gigante, pela sua bondade, por está sempre ao meu lado, te amo infinitamente.

A meu orientador, **Prof. Pedro José Rolim Neto**, pela oportunidade concedida de poder desfrutar de seus ensinamentos e de sua amizade.

A minha co-orientadora, **Profª Maria do Carmo Alves de Lima**, pela oportunidade e contribuição para meu crescimento profissional, e por me permitir desfrutar de sua amizade, minha eterna gratidão.

Aos amigos de equipe **Salvana Costa, Larissa Rolim, Giovanna Medeiros e Ricardo Tadeu**, pelo empenho no desenvolvimento desse trabalho, pela amizade, companheirismo e carinho, vocês foram meus anjos da guarda.

A **Profª Drª Rosali Maria Ferreira da Silva**, pelos ensinamentos e pela amizade.

A **Universidade Federal do Amazonas**, por entender a importância da formação do seu corpo docente, obrigada pelas minhas liberações.

Aos amigos que fiz na UFAM, **Sandrea Sales, Nívea Guedes, Gilmara Carvalho, Izabella Garcia, Kenni Venente, Estrela Vinente, Sandro Jesus, Joaquim Gabael, Daniel Tarciso, Cleuton Souza**, obrigada pela força, por tornarem a minha estada no Amazonas mais leve.

Ao **Laboratório de Tecnologia de Medicamentos - LTM** pela oportunidade de realizar este trabalho e a **todos os seus integrantes** pela aprendizagem diária regada a muitas risadas.

Aos **pesquisadore**s do **Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos - LPSF,** pela ajuda, companheirismo e amizade. Em especial a **Jamerson Oliveira,** pela grande ajuda em sintetizar o protótipo.

Ao **Centro de Tecnologia do Nordeste – CETENE** e a **Central Analítica da UFPE,** pela colaboração na realização das análises.

A **Sandrea Sales, Agamedilza Sales, Sara Calvet, Sandro Sales, Suelen Tavares, Sávio Sales, Lucas Sales** e **Ivan Oliveira**, por me receberem tão bem e permitirem tornar-me um membro da família. Não sei como seria a minha vida no Amazonas sem vocês, minha eterna gratidão.

A todos os **amigos** que colecionei durante a minha vida. Em especial a **Myrtes Fabiana Pereira Bezerra** e **Márcio Daniel de Lima**, amigos para todas as horas; já passamos por muitas coisas juntos, juntos sempre.

"Se você pode achar um caminho sem obstáculos,
provavelmente ele não leva a lugar nenhum"
(Frank A. Clark)

RESUMO

A esquistossomose mansonica, uma doença negligenciada, é considerada um grave problema de saúde pública no Brasil. Apenas dois medicamentos – Praziquantel e Oxamniquina - estão disponíveis para o tratamento desta doença. O Praziquantel é o fármaco de primeira escolha, no entanto sua toxicidade associada a casos já registrados de resistência do parasita leva a procura por novas alternativas terapêuticas. O 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4), é um derivado imidazolidinico, que apresentou resultados promissores no combate ao *S. mansoni*. No entanto, esta nova entidade química possui limitada solubilidade aquosa (S < 1µg/mL) o que constitui um sério problema para o desenvolvimento de formas farmacêuticas. O presente estudo abrangeu a caracterização físico-química, estabilidade térmica e compatibilidade fármaco-excipiente por técnicas espectroscópicas (UV, IV, RMN, MEV e MS), temoanalíticas (DTA, DSC e TG). Bem como técnicas para análise a nível particular e de seus aglomerados respectivamente (DRX, e determinações de 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. Foi desenvolvido e validado o método analítico de doseamento do LPSF/FZ4 por espectrofotometria de UV-Visível, e foi realizado o estudo de solubilidade de fases do LPSF/FZ4 frente aos polímeros hidrofílicos polivinilpirrolidona (PVP) K-30, Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), PEG 4000, PEG 6000 e os surfactantes/emulsionantes laurilsulfato de sódio (LSS); Polisorbato 80 e Myrj 52®. 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, com ponto de fusão em 228°C (ΔH= -178 Jg^{-1}) apresentando pico endotérmico de fusão característico de uma forma cristalina que foi corroborado pela difração de raio-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 ºC onde a degradação térmica ocorreu em um estágio entre 320 – 370 ºC com perda de massa em torno de 60%. Foi considerado um pó finíssimo com tamanho de particula entre 10 e 100 µm, bem como uma área superficial em torno de 5.2277 m²/g. No entanto, apresenta baixa solubilidade aquosa (0,01 mg/mL). Provavelmente devido a sua conformação estrutural apresentar fortes forças de atração interatômica. Com tudo, 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 LSPF/FZ4 com a lactose e o polissorbato, ambas associadas à diminuição da estabilidade térmica do protótipo, com redução considerável da temperatura de degradação e de fusão. Os métodos desenvolvidos e validados apresentaram a confiabilidade requerida para um método analítico segundo a RE 899, de 2003, da ANVISA. No estudo de solubilidade de fases, o polímero hidrofílico e o surfactante/emulsionante que obtiveram o melhor desempenho foram o PVP K-30 e o polissorbato 80, respectivamente. Concluí-se que a realização de todas as análises utilizadas bem como o desenvolvimento e validação de um método analítico fornecem bases sólidas para que a nova entidade química possa vir a se tornar um medicamento, o que seria vir a ser uma nova alternativa terapêutica para a esquistossomose mansônica.

Palavras-Chave: esquistossomose. imidazolidina. LSPF/FZ4.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni, a neglected disease, is considered a serious public health problem in Brazil. Only two medicines - praziquantel and oxamniquine - are available to treat this disease. The praziquantel is the first choice drug, however its toxicity associated with cases already registered of parasite resistance lead the search for new therapeutic alternatives. O 3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-imidazolidine-2 ,4-dione (LPSF/FZ4), is an imidazolidine derivative, which presented promising results in combating S. mansoni. However, this new chemical entity has limited aqueous solubility (S < 1µg/mL) what constitutes a serious problem for the development of pharmaceutical forms. This study covered the physicochemical characterization, thermal stability and drug-excipient compatibility by spectroscopic techniques (UV, IR, NMR, MS and SEM), thermal analytical techniques (DTA, DSC and TG) as well as to analyze their 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. It was carried out the development and validation of a method for UV-visible spectroscopy and it was also performed a solubility study of phases with LPSF/FZ4 using hydrophilic polymers - polyvinylpyrrolidone (PVP) K-30, Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), PEG 4000, PEG 6000 - and surfactants/emulsifiers - sodium lauryl sulfate (LSS); polysorbate 80 and Myrj 52. 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 (ΔH= -178 Jg^{-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. The method developed and validated presented the reliability required for one analytical method according to RE 899/03 of ANVISA. In the solubility study of phases, the hydrophilic polymer and the surfactant/emulsifier which achieved the best performance were PVP K-30 and polysorbate 80, respectively. In conclusion, all analyzes used as well as the development and validation of an analytical method, provide a solid bases for the new chemical entity become a medicine, which would be a new therapeutic alternative for *Schistosomiasis mansoni*.

Keywords: schistosomiasis. imidazolidine. LPSF/FZ4.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Rota sintética do LPSF/FZ4 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Métodos utilizados na caracterização do LPSF/FZ4 46
Figura 2- Fluxograma para a avaliação da estabilidade térmica do LPSF/FZ4..... 51
Figura 3- Espectro na região do Infravermelho do LPSF/FZ4..... 64
Figura 4 – Espectro de RMN'H do LPSF/FZ4..... 66
Figura 5 - Representação ORTEP-3 da molécula do LPSF/FZ4..... 67
Figura 6- Espectro de massas do LPSF/FZ4 69
Figura 7- Interações de hidrogênio intermoleculares do LPSF/FZ4 70
Figura 8 - Curvas TG e DSC do LPSF/FZ4 obtidas a 10ºC/min, com massa de 3 mg, sob atmosfera de N_2 em fluxo de 50 mL/min 71
Figura 9- Difratograma de Raios-X e Fotomicrografias do LPSF/FZ4..... 72
Figura 10- Distribuição de frequência do tamanho das partículas de LPSF/FZ4..... 73
Figura 11- DSC e TG / DTG do LPSF/FZ4 obtidos em atmosfera de dinâmica do nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 ° C/min 74
Figura 12- Curva DSC do LPSF/FZ4 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..... 75
Figura 13- Curvas TG e o gráfico de Ozawa do LPSF/FZ4 obtido nas razões de aquecimento de 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 12,5 ºC/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico 76
Figura 14- Curvas isotérmicas do LPSF/ FZ4 nas temperaturas 260, 270, 280, 290 e 300ºC na atmosfera de N_2 (50 mL/min) 77
Figura 15- Gráfico de Arrhenius, ln t vs 1 / T, para a decomposição térmica das amostras de LPSF/FZ4 78
Figura 16- Curvas DSC do LPSF/FZ4 e excipientes obtidos em atmosfera dinamica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento 10°C/min 80
Figura 17- Curvas TG do LPSF/FZ4 e excipientes obtidos em atmosfera dinamica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento 10°C/min 80
Figura 18 - Espectro na região do IV das misturas físicas 1:1 LPSF/FZ4 com Lactose, PVP e Polissorbato 80 81
Figura 19- Curvas isotérmicas da mistura física 1:1 entre LPSF/ FZ4 e lactose em diferentes temperaturas na atmosfera de N_2 (50 mL/min)..... 82

Figura 20 - Gráfico de Arrhenius, ln t vs 1 / T, para a decomposição da mistura física 1:1 entre LPSF/FZ4 e lactose 82
Figura 21 - 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 83
Figura 22- Estrutura química do LPSF/FZ4 e varredura espectrofotométrica no sistema solvente selecionado acetonitrila:água (35:65 v/v) 85
Figura 23- Gráfico de linearidade do método desenvolvido 87
Figura 24 - Cromatograma do LPSF/FZ4 do método cromatográfico desenvolvido 90
Figura 25 - Cromatograma de análise da amostra de LPSF/FZ4 associada ao LPSF/FZ1 - parâmetro e especificidade 91
Figura 26 - Cromatograma em 3D de análise da amostra de LPSF/FZ4 associada ao LPSF/FZ1 - parâmetro e especificidade 92
Figura 27 - Gráfico de linearidade do método desenvolvido 93
Figura 28 - Cromatograma da matéria-prima obtido pelo método desenvolvido..... 96
Figura 29 - Varreduras espectrofotométricas: (A) pico maior e (B) pico menor 96
Figura 30 - Cromatograma obtido com o método desenvolvido em CLAE –MS-MS... 97
Figura 31 - Curvas do diagrama de solubilidade com polímeros hidrofílicos..... 100
Figura 32 - Curvas do diagrama de solubilidade do LPSF/FZ4 com os agentes surfactantes/emulsionantes 100

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..... 30
Tabela 2. Distâncias e ângulos das interações de hidrogênio..... 67
Tabela 3. Principais dados cristalográficos da LPSF/FZ4..... 68
Tabela 4: Resultados experimentais para o estudo de solubilidade quantitativo do LPSF/FZ4 70
Tabela 5: Dados termoanalíticos do LPSF/FZ4 e das misturas binárias com excipientes 79
Tabela 6: Parâmentros cinéticos obtidos pelo método nao isotérmico e Energia de ativação..... 83
Tabela 7: Resultados experimentais do desenvolvimento do método em relação a tempo de ultrassonicação, com intervalo de confiança de 95%. 85
Tabela 8: Resultados da Especificidade do método 86
Tabela 9: Dados da Precisão Intermediária 88
Tabela 10: Resultados experimentais obtidos para a reprodutibilidade 88
Tabela 11: Dados referente a Exatidão do método..... 89
Tabela 12: Repetibilidade do LPSF FZ4 94
Tabela 13: Dados da Precisão Intermediária 94
Tabela 14: Dados referente a Exatidão do método..... 95
Tabela 15: Análise do estudo de solubilidade do LPSF/FZ4 obtidos com os carreadores a 25 ºC para as concentrações de melhor desempenho..... 99
Tabela 16: Valores de energia livre de Gibbs (ΔG°=J.mol^{-1}) para o processo de solubilização do LPSF/FZ4 em meio aquoso com diferentes carreadores a 25 ºC. 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-CD	β-ciclodextrina
CI	Complexo de inclusão
^{1}H RMN	Ressonancia Magnética Nuclear de H1
CM	Carboximetilcelulose
DNERu	Departamento Nacional de Endemias Rurais
DRX	Difração de raios X
DS	Dispersões Sólidas
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogavimetia Diferencial
Eq.	Equação
FDA	*Food and Drug Administration*
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HP-β-CD	Hidroxipropil-β-Ciclodextrina
IC	Concentração Inibitória
ICH	*International Conference on Harmonisation*
INERu	Instituto Nacional de Endemias Rurais
IT-TOF	Analisador de Massas por Tempo de Vôo
IV-TF/ATR	Infravermelho por Transformada de Fourrier e Reflectância Total Atenuada
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
LSS	Laurilsulfato de Sódio
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Espectro de Massas
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	*Quality by Design*
SQR	Substância Química de Referência
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
SUS	Sistema Único de Saúde
TDR	Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TG	Termogavimetria
TGR	Tiorredoxina Glutationa Redutase
UV-Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ϴ	Teta
ϴ/s	Teta/segundo
$^{\delta}$	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
β	Beta ou Razão de aquecimento
Δ	Delta ou Variação
ΔH	Variação da energia entálpica
λ	Comprimento de onda
π	Ligação pi
σ	Ligação sigma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23
2. OBJETIVOS 26
2.1 Objetivo Geral 26
2.2 Objetivos Específicos 26
3. REVISÃO DA LITERATURA 28
3.1 Esquistossomose 28
3.2 Política Publica Nacional de Combate a Esquistossomose 29
3.3 Alternativas Terapêuticas para o Tratamento da Esquistossomose 31
3.4 Novos fármacos 37
3.5 *Quality by Design* (QbD) 39
4. MATERIAL E MÉTODOS 44
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NOVA ENTIDADE QUÍMICA 3-(4-CLORO-BENZIL)-5-(4-NITRO-BENZILIDENO)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA (LPSF/FZ4) 44
4.2 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO LPSF/FZ4 E CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS 50
4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS LPSF/FZ4. 53
4.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD) DO LPSF/FZ4 56
4.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEMANETO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISOMERO DO LPSF/FZ4 59
4.6 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES 61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 64
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NOVA ENTIDADE QUÍMICA: 3-(4-CLORO-BENZIL)-5-(4-NITRO-BENZILIDENO)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA (LFPS/FZ4) 64

5.2 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO LPSF/FZ4 E CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS..... 74
5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS DO LPSF/FZ4 84
5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD) DO LPSF/FZ4 89
5.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEMANET POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISOMERO DO LPSF/FZ4 95
5.6 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES..... 98
6. CONCLUSÃO..... 103
7. PERSPECTIVAS..... 106
8. REFERÊNCIAS..... 108
APÊNDICE 119

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose 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, relacionada a precárias condições de higiene e inadequados recursos sanitários, estando essa endemia associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico. Estas áreas situam-se preferencialmente 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 Oxaminiquine 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).

O 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4) faz parte de uma ampla classe de compostos ativos derivados heterocíclicos pentagonais imidazolidínicos e que apresenta 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 (OLIVEIRA et al., 2004).

Por se tratar de uma nova entidade química, as propriedades físico-químicas do LPSF/FZ4 são 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, 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).

A maioria das novas entidades químicas possue 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.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de metodologia analítica de doseamento da nova entidade química 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4).

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente por IV, RMN'H, UV, MS, Estudo de Solubilidade, Cálculo de logP, DSC, TG, DRX, MEV, Análise Granulométrica e determinar a Área Superficial da nova entidade química LPSF/FZ4;
- Determinar a estabilidade térmica da nova entidade química através de técnicas termoanalíticas como Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Termogavimetria (TG);
- Avaliar a cinética de degradação térmica pelos métodos isotérmico e não isotérmico;
- Realizar estudo de compatibilidades física e química frente a excipientes;
- Desenvolver e validar método analítico de doseamento por espectrofotometria UV-Visivel;
- Desenvolver e validar método analítico de doseamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia (CLAE-DAD);
- Desenvolver método analítico de doseamento para identificação de isômero por Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia;
- Realizar estudo de solubilidade de fases utilizando os polímeros hidrofílicos polivinilpirrolidona (PVP) K30, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), PEG 4000, PEG 6000 e os surfactantes/emulsionantes laurilsulfato de sódio (LSS); Polisorbato 80,Myrj 52®.

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 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 *Schistossomatidae* 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).

3.2 Política Pública Nacional de Combate a Esquistossomose

Em 1953, o Governo Federal realizou uma Campanha contra a Esquistossomose, sendo este o passo inicial do governo na tentativa de erradicar essa protozooze. 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 Aggeu 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.

3.3 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 (CHRISTOPHERSON, 1918; NOVAES et al., 1999).

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 (±)-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 Na^{+}-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 seria a tolerância a essa dose mais alta. Com a dose de 50 mg/kg curaram-se 59,0% 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 do que sob a forma de comprimidos laqueados.

A oxamniquina apresenta menor custo em relação ao praziquantel (KOROKOLVAS, 1999). É ativa nas formas intestinal e hepatesplênica 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). E obtida em 1972 por Kaye e Woolhouse por meio de hidroxilação microbiana da tetraidroquinolina. Estruturalmente, corresponde ao (±)-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 ^{1}H, 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 mansoni (LESCANO et al., 2004).

Tártaro emético, por exemplo, uma droga de longa data descartado, foi recentemente reconsiderada para o tratamento da esquistossomose como lipossoma conjugado. Aparentemente, a nova forma de apresentar a droga não só reduz a atividade toxicidade, mas alargado 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 é 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 de ambas as β-CD e HP-β-CD. Portanto, a melhoria na solubilidade aquosa foi observada em relação ao fármaco que provavelmente deverá ter a biodisponibilidade oral 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), etc, têm sido relatados previamente para aumentar a complexação de várias moléculas da droga 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 a droga e 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%, em 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 poli láctico-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, o praziquantel é atualmente fabricado e administrado como uma mistura racêmica. A adoção de um método de síntese enantiosseletiva deve, portanto, fornecer uma droga 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 assenta 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).

Vários métodos de produzir o componente esquistossomicida puro existem, porém são consideravelmente mais caros do 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 tomada, 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 Pepitídeo.

Seis biomoléculas foram selecionadas pela Organização Mundial da Saúde como possíveis promissoras candidatas à vacina contra a esquistossomose humana: a) glutationa 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 sílico*. 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 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 um possível potencial como candidatos vacinais (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 dessa única droga eficaz para controle da esquistossomose. Portanto, além do desenvolvimento de novas drogas, 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.

3.4 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 imidazolodinônicos 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 patologias, 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 antiparasitário, são os oxadiazóis.

Sayed et al. (2008) identificaram oxadiazol 2-óxidos como novos compostos para quimioterapia da esquistossomose. Tais compostos 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 matança do parasita.

Poucos grupos de produtos de origem vegetal têm notáveis propriedades antiparasitárias, tais como alcaloides de quinolina contra *Leishmania amazonensis*, alcaloides indólicos contra *Plasmodium e Entamoeba* e sesquiterpenos contra *Plasmodium*. Investigação semelhantes com Schistosoma usando essas novas formulações de drogas 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 muito boa (DOENHOFF et al., 2008; YANG et al., 2005).

Esses compostos são bem tolerados e apresentam apenas pequenos efeitos secundários, mas o seu mecanismo de ação sobre a esquistossomose ainda não é totalmente compreendido. Artemisininas são de especial interesse porque são mais ativos contra vermes imaturos do 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 mãe 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 *S. japonicum* e exibiram moderada potência antiparasitária.

3.5 *Quality by Design* (QbD)

Estudos de pré-formulação são projetados para fornecerem dados necessários – fisico-químicos, físico-mecânicos e propriedades biofarmacêuticas do fármaco, excipientes e materiais de embalagem – que possam influenciar no desenvolvimento da

formulação, no processo de produção, na farmacocinética, nas propriedades biofarmacêuticas do produto acabado e na embalagem de acondicionamento escolhida (GOPINATH, NAIDU, 2011; SOARES-SOBRINHO, et al., 2010).

O desenvolvimento de produtos na indústria farmacêutica vem passando por uma transformação com base no paradigma *Quality by Desing* (QbD) que se manifesta em vários guias regulatórios (CUI, et al., 2012).

O conceito de *QbD* na área farmacêutica é uma abordagem sistemática, científica e pró-ativa para o desenvolvimento farmacêutico, que começa com objetivos pré-definidos que enfatizam os produtos, a compreensão e o controle de processo (ENDE, et al. 2007; GARCIA, COOK, NASSAL, 2008; YU, 2008).

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 muito implementado na indústria farmacêutica (ICH Q8., 2009).

3.5.1 Caracterização de Fármacos

Os fármacos possuem características importantes que precisam ser estudadas, como solubilidade, coeficiente de partição, dissolução intrínseca, forma física de apresentação e estabilidade. Para isto utilizam-se diversas técnicas analíticas que, em geral, são especificadas na monografia de cada fármaco disponível em compêndios oficiais. Dentre elas, podem-se citar a análise térmica, difração de raios-X, técnicas espectrométricas, microscópicas, cromatográficas, entre outras (HUANG, TONGB, 2005; NERI, et al., 2008; SOARES-SOBRINHO, et al., 2010b).

A taxa de solubilidade e de dissolução de insumos farmacêuticos ativos são de grande importância em estudos de pré-formulação de produtos, principalmente para produtos administrados por via oral. Para que ocorra a absorção do fármaco faz-se necessário que suas moléculas estejam em solução no local de absorção, logo, a

solubilidade em água é um processo inicial de triagem de novas moléculas candidatas a fármaco (SAXENA, et al., 2009).

No panorama atual em que 95% dos fármacos disponíveis são ácidos ou bases fracas, os parâmetros de pH e pK_a serão determinantes no processo de dissolução e, portanto na absorção. Logo, alterações no pH durante a dissolução podem afetar significativamente a biodisponibilidade (SACHAN et al, 2009).

Além das características físico-químicas, os fatores fisiológicos e relacionados às características farmacêuticas influenciam na velocidade e extensão da absorção, parâmetros que fundamentam o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). O SCB divide os fármacos em classes de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade. A descoberta de substâncias com alta lipofilicidade e baixa solubilidade aquosa é um problema cada vez mais comum no desenvolvimento de novas formulações administrada por via oral, visto que a maioria dos medicamentos registrados pertence ao SCB classe II (alta permeabilidade, baixa solubilidade) ou IV (de baixa permeabilidade, baixa solubilidade) (LEHTO, et al., 2011; SCHAN, et al., 2009).

A disposição ordenada dos átomos presentes em um material sólido cristalino separados entre si por distâncias interplanares da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Uma vez determinada a estrutura cristalina, pode-se avaliar as intra e intermoleculares, bem como a conformação e empacotamento das moléculas. Por poder determinar todos esses parâmetros essa é a técnica mais adequada para determinação de polimorfos (STORPIRTIS et al., 2011).

A denominação de polimorfismo, quando aplicado a sólidos, implica em cristais constituídos de unidades estruturais localizadas em três dimensões no espaço, apresentando uma orientação particular, com forma e volume definidos, através da configuração espacial dos seus átomos e moléculas, aos quais são necessários para a geração do cristal (VIPPAGUNTA et al., 2001).

Polimorfos cristalinos apresentam a mesma composição química, mas diferentes estruturas cristalinas internas, o que leva a diferentes propriedades físico-químicas. As diferentes estruturas cristalinas surgem quando a substância cristalina com diferentes formas de empacotamento, gerando diferentes conformações. O que pode ser decorrente da naturea do solvente, temperatura e taxa de arrefecimento. (VIPPAGUNTA et al., 2001; GRANT E BYRN, 2004). Fato este que altera as propriedades dos fármacos

como: solubilidade, ponto de fusão, densidade, dureza, configuração do cristal, propriedades ópticas e elétricas e pressão de vapor (GONZALES, 2007).

Na área farmacêutica, para avaliação de compatibilidade, caracterização térmica, determinação de pureza e quantificação de fármacos e excipientes, tem-se utilizado amplamente as análises térmicas. Vários estudos descrevem a aplicação da termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), na identificação, determinação de estabilidade e decomposição térmica de inúmeros insumos farmacêuticos ativos (OLIVEIRA, et al., 2010; SOARES-SOBRINHO, 2010; SOVIZI, 2010; TITA et al., 2010).

Já a análise de granulométrica tem por finalidade obter dados sobre o tamanho, a distribuição e a forma das partículas. Devido a maioria dos insumos farmacêuticos apresentarem-se sobre a forma sólida, avalia-se o fármaco e os demais componentes que serão utilizados na formulação (LU, ROHANI, 2009; STORPIRTIS, et al, 2009).

A distribuição granulométrica do pó afeta a produção de medicamentos nas etapas de mistura e enchimento dos equipamentos, além de interferir em sua estabilidade e eficácia terapêutica. Os pós, quando apresentarem tamanhos diferentes de partícula, deverão possuir, diferentes propriedades de fluxo e empacotamento, as quais se correlacionam com a sua velocidade de dissolução, parâmetro que merece atenção especial, além de um controle rigorosso (AULTON, 2005; LIMA, et al., 2011).

A espectroscopia no IV é uma técnica muito importate na caracterização de física de fármacos sólidos. Esta técnica baseia-se na exposição da amostra a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda na região do infravermelho, que induz transições vibracionais e rotacionais (STORPIRTIS, et al., 2011).

Na microscopia eletrônica de varredura, a detecção dos eletrons secundários é responsável pela imagem de alta resolução da topografia da superfiie da amostra analisada, o que a torna uma técnica muito útil para a caracterização dos diferentes hábitos e efeitos superficiais dos polimorfos (STORPIRTIS, et al., 2011).

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

PARTE EXPERIMENTAL I

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NOVA ENTIDADE QUÍMICA 3-(4-CLORO-BENZIL)-5-(4-NITRO-BENZILIDENO)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA (LPSF/FZ4)

Por se tratar de uma nova entidade química (NEQ), 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).

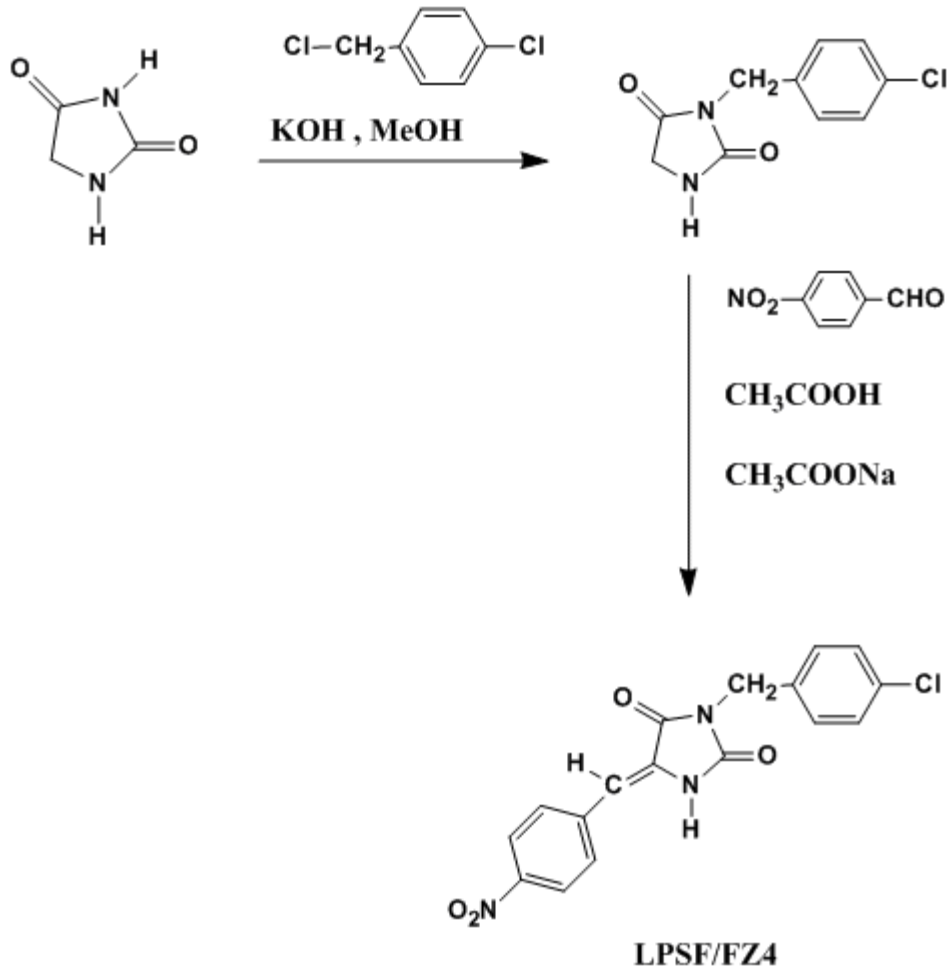
4.1.1 Material

LPSF/FZ4 (Lote 01, 98,00%), 3-(4-Cloro-Benzil)-5-(4-Nitro-Benzilideno)-Imidazolidina-2,4-Diona, fornecido pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (LPSF/UFPE), com pureza estimada por DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial). Na etapa de solubilidade foram utilizados etanol (J.T.BAKER®), acetonitrila (J.T.BAKER®), metanol (J.T.BAKER®) e acetona (Dinâmina®) e água destilada.

4.1.2 Síntese do Protótipo

O LPSF/FZ4 foi sintetizado pela *N*-alquilação do anel imidazolidínico utilizando-se cloreto de 4-clorobenzila, seguido da condensação tipo Knoevenagel com

4-nitro-benzaldeído (Esquema 1) 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.



Esquema 1- Rota sintética do LPSF/FZ4

4.1.3 Caracterização físico-química

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

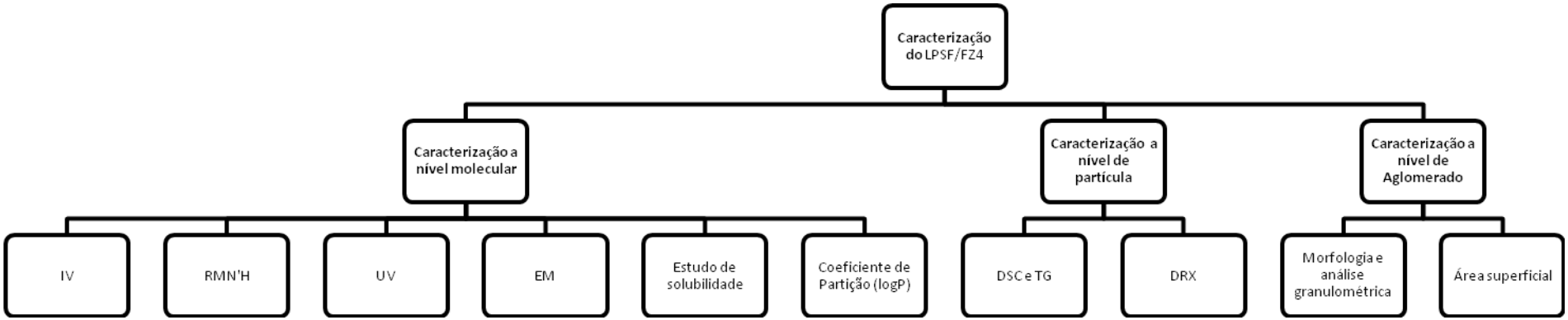


Figura 1- Métodos utilizados na caracterização do LPSF/FZ4

4.1.3.1 Caracterização a nível molecular

Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

O espectro no infravermelho foi obtido utilizando-se 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 (RMN H^1)

Os espectros de ^1H RMN unidimensional foram obtidos em um espectrômetro Varian® VNMRS-400**,** operando na frequência de 399,7 MHz, utilizando-se $CDCl_3$ 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 sequência 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^o, tempo de aquisição de 2,049 s, 32 transientes, largura espectral de 6410,3 Hz e 262 k pontos de memória.

Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Foram preparadas soluções do LPSF/FZ4 (10 µg/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-se 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 vôo (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 LSPF/FZ4 foram solubilizadas nos solventes já citados, ultrassonicadas por 5 min e posteriormente filtradas obtendo-se uma solução saturada. 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, prepararam-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 346 nm.

Coeficiente de partição (logP)

Com o advento da informática e consolidação da internet vários programas de acesso podem ser encontrados para estimar o valor log P (Tetko, 2005). Um estudo realizado anteriormente por Kajitani et al. (2009) constataram que a realização do cálculo teórico de log P é suficiente para avaliar o seu valor. Assim, o log P de LPSF/FZ4 foi calculado através de um dos sites que permitem esse cálculo, o Laboratório de Química Computacional Virtual (VCCLAB, 2012).

4.1.3.2 Caracterização a nível de partícula

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 verificação tomou-se como base a Equação de van't Hoff (Equação 1).

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{\Delta H^\circ}{R}\left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right] \quad \text{Eq. 1}$$

Para a termogravimetria (TG) as análises foram realizadas 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 10ºC.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 0,02º 2θ/s. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

4.1.3.3 Caracterização a nível de aglomerado

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 de 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 purificada na razão de 1 mg/mL. Esta

dispersão foi agitada no banho Ultrassônico Unique® mod USC-1400ª, com potencia ultrassonica 135 Watts, durante 5 mim antes de ser analisada. As analises foram realizadas em quintuplicada.

Área superficial

A medida da área superficial específica foi obtida por adsorção física de nitrogênio sobre o 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 desgaseificadas por 48 h 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.

PARTE EXPERIMENTAL II

4.2 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO LPSF/FZ4 E CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS

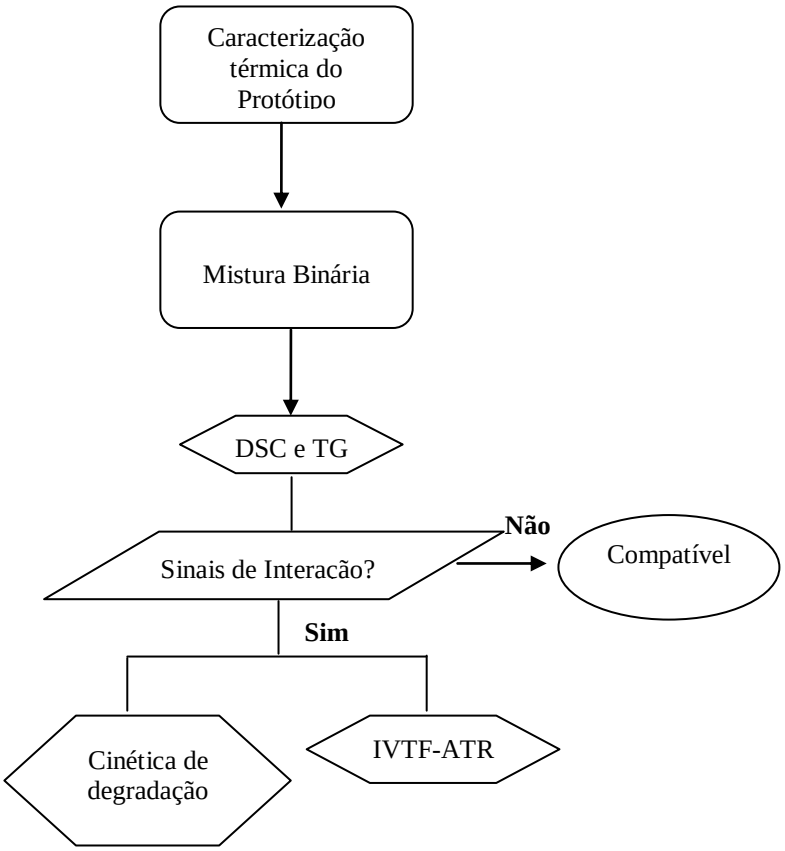
4.2.1 Material

LPSF/FZ4 (Lot. 01), 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona, fornecido pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF), da Universidade Federal de Pernambuco, com pureza elevada de 98% estimada por DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial). Os excipientes usados foram celulose microcristalina (CM) (Blanver Farmoquímica Ltda®), β-ciclodextrina (βCD) (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®).

4.2.2 Metodologia

O fluxograma (Figura 2) apresenta o protocolo utilizado para a avaliação da estabilidade térmica do LPSF/FZ4. Primeiramente, medidas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TG), somadas as 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 (1:1 p/p) 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 analise no infravermelho.

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



4.2.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC para o protótipo 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 cadinhos de alumínio, na razão de 10°C/min, até a temperatura de 600ºC. As determinações foram realizadas em triplicata. Realizou-se a calibração do DTA e do DSC utilizando como padrões o Índio (156,6ºC ± 0,3) e Zinco (419,6ºC ± 0,3). O fluxo de calor e entalpia foram calibrados utilizando do Índio (28,59 ± 0,3 J.g-1), sob as mesmas condições das amostras.

4.2.2.2 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 (± 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).

4.2.2.3 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 (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1984).

Foram utilizadas razões de aquecimento 2,5, 5,0, 7,5, 10 e 12,5° C.min-1, escala de temperatura entre 30-600 ° C, em cadinhos de alumínio 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, razão de 10ºC.min^{-1}, e mantidas em condições isotérmicas em atmosfera de N_2 (50 mL min^{-1}) durante o tempo necessário para uma perda de massa 10% (±0,5) em cadinhos de alumínio com aproximadamente 6 mg de amostras. O cálculo da energida de ativação é baseado na equação de *Arrhenius* (Equação 2).

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \qquad \text{Eq. 2}$$

Em que A representa o fator de frequência ou constante pré-exponencial; k a constante de velocidade; E_a é a energia de ativação; R a constante dos gases e T a temperatura.

4.2.2.4 Espectrometria 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 droga-excipiente analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de 650 a 4000 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1}.

PARTE EXPERIMENTAL III

4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS LPSF/FZ4

4.3.1 Material

4.3.1.1 Matérias-Primas e reagentes

No desenvolvimento do método analítico foi utilizado o LPSF/FZ4 padrão de trabalho (lote PS01) com pureza de 98%, estimada por DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) e para a validação da metodologia analítica foi utilizada o LPSF/FZ4 matéria-prima (lote 03) com pureza de 97% estimada por DSC, produzidos pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE- Recife, Pernambuco, Brasil). Para construção da curva controle foi utilizado um Padrão de Trabalho do LPSF/FZ4 (lote PS01).

Água ultra-purificada obtida por Milli-Q Millipore® (Milli-Q® System), acetonitrila (Merc® e Carlo Erba®), etanol (J.T.Baker®), metanol (J.T.Baker®) foram utilizados como solventes para a preparação das amostras e das curvas controle. Todos os solventes empregados foram de grau analítico. Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas com certificado de calibração por lote do fabricante Satelit®.

4.3.1.2 Equipamentos

Balança Analítica (Bioprecisa®, modelo FA2104N), Ultrassom 1500 (Barson®), Espectrofotômetro UV-Visível (Micronal®, modelo B-582), forma utilizados no estudo. Para a reprodutibilidade foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica (Marte®, modelo AY220), Ultrassom 2.510 (Barson®), Espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu®, modelo mini-1240).

4.3.2 Desenvolvimento do Método Analítico

Para o desenvolvimento do método como solventes de solubilização do LPSF/FZ4, testou-se a solubilidade deste composto nos solventes acetonitrila, metanol e etanol a temperatura de 25ºC. Observou-se o comportamento da NEQ em diferentes solventes, com o objetivo de identificar a melhor solução diluente para o método analítico desenvolvido. Foram levadas em consideração o poder de solubilização do fármaco, estabilidade da solução, e sensibilidade do fármaco frente ao comprimento de onda utilizado. Diante disto, desenvolvimento do método seguiu-se com a realização de uma varredura no UV-Visível de 200 a 800 nm, do padrão de trabalho, nos diferentes solventes propostos, objetivando-se identificar o comprimento de onda no qual o protótipo apresentasse valor máximo de absorvância.

Após a identificação do melhor solvente e determinação do comprimento de onda, foram testadas variações, avaliando-se os seguintes parâmetros: tempo de sonicação (5, 10 e 15 min) e variação da concentração do diluente acetonitrila:água (35:65, 40:60 e 45:55 (v/v)).

4.3.3 Preparação das amostras

Foram pesadas, em triplicata, 10 mg do LPSF/FZ4 e diluídos em acetonitrila. Pós sonicação durante 10 minutos, as amostras foram aferidas em balão volumétrico obtendo-se uma concentração final de 100 µg/mL. Foram retiradas alíquotas da amostra volumétrica que foram diluídas em solução acetonitrila: água (35:65 v/v) obtendo-se a concentração final de 6 µg/mL. As amostras foram lidas no comprimento de onda 346 nm.

4.3.4 Preparação da curva-controle

Foi preparada uma solução mãe de LPSF/FZ4 com o padrão de trabalho em acetonitrila, com posteriores diluições volumétricas utilizando a solução acetonitrila:

água (35:65 v/v), para obtenção da curva de calibração com as concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL.

4.3.5 Validação do método analítico

O método foi validado seguindo parâmetros de linearidade, intervalo, robustez, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação de acordo com as normas estabelecidas na *International Conference on Harmonization* (ICH Q2A e ICH Q2B) e a RE 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A confiabilidade dos parâmetros estudados pode ser observada pelo coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. Para os estudos realizados, foi determinado um coeficiente de variação menor que 5 % (BRASIL, 2003). Para cada parâmetro avaliado foi realizado análise estatística dos resultados obtidos, utilizando a Análise de Variância One-Way e Two-Way e teste t Student.

O parâmetro seletividade foi verificado através da comparação do valor obtido pela mesma análise realizada com amostras obtidas com a matéria-prima LPSF/FZ4 e de amostra contaminada com o precursor de síntese LPSF/FZ1, uma vez que o LPSF/FZ1 tem sua estrutura química muito semelhante à NEQ LPSF/FZ4.

A variação média do estudo foi realizada no intervalo de 33 a 166%. Foi preparada uma solução mãe de LPSF/FZ4 em acetonitrila com 10 minutos de agitação por ultrassonicação na concentração de 100 µg/mL. Posteriores diluições volumétricas foram realizadas, utilizando o sistema solvente acetonitrila:água (35:65 v/v) para constituição e análise de três curvas autênticas nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. Os resultados foram tratados estatisticamente, por cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) é de 0,99 (Brasil, 2003).

Já os limites de detecção e de quantificação foram calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (b) das três curvas do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares (a) das respectivas curvas multiplicadas por 3 e 10, respectivamente.

No parâmetro robustez foi analisada a possível influência de pequenas variações ocasionadas pelo tempo de agitação (9, 10 e 11 min) e pelo fabricante do solvente utilizado, acetonitrila (Merck® e Carlo Erba®).

A precisão foi avaliada em 3 níveis: repetibilidade (precisão intera-corrida), precisão intermediária (precisão inter-corridas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). Na repetibilidade, o método foi verificado por 6 determinações autênticas a 100% da concentração do teste (6 µg/mL), analisadas em um pequeno intervalo de tempo. Na precisão intermediária, foram realizadas análises em 2 dias diferentes com 2 analistas diferentes e a reprodutibilidade foi realizada em dois laboratórios diferentes em triplicata de amostras.

A exatidão do método foi determinado após o estabelecimento da linearidade e do intervalo, sendo verificada a partir de amostras obtidas com a matéria-prima LPSF/FZ4, em triplicata, para cada concentração teórica.

PARTE EXPERIMENTAL IV

4.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD) DO LPSF/FZ4

4.4.1 Material

4.4.1.1 Matérias-Primas e reagentes

No desenvolvimento do método analítico, foi utilizado o LPSF/FZ4 padrão de trabalho (lote PS01) com pureza de 98%, estimada por DSC (Calorimetria exploratória diferencial) e para a validação da metodologia analítica foi utilizada o LPSF/FZ4 matéria-prima (lote 03) com pureza de 97% estimada por DSC, produzidos pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE- Recife, Pernambuco, Brasil). Para construção da curva controle, foi utilizado um Padrão de Trabalho do LPSF/FZ4 (lote PS01).

Água ultra-purificada obtida por Milli-Q Millipore® (Milli-Q® System), acetonitrila (Merck® e Carlo Erba®), etanol (J.T.Baker®), metanol (J.T.Baker®) grau HPLC, foram utilizados como solvente para a preparação das amostras e das curvas de calibração e filtradas em membranas filtrantes de porosidade de 0,22 µm Millipore®. Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas com certificado de calibração por lote do fabricante Satelit®.

4.4.1.2 Equipamentos

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® equipado com bomba binária LC – 10 ADVP, auto-injetor SIL – 10 ADVP, detector UV SPD – 10 AVP, controlador de sistema SCL – 10 AVP e forno para coluna CTO – 10 ASVP, Balança Analítica (Bioprecisa®, modelo FA2104N), Ultrassom 1500 (Barson®), foram utilizados no estudo.

4.4.2 Desenvolvimento do Método Analítico

Com os dados de melhor solvente e comprimento de onda, previamente no desenvolvimento do método analítico de doseamento espectrofotometria de UV-Vis, deu-se continuidade ao desenvolvimento do método analítico de doseamento por CLAE-DAD avaliando-se os seguintes parâmetros: temperatura do forno (variando de 25 a 80ºC), fase móvel acetonitriila:água (60:40; 70:30), fluxo (1,0; 1,5 e 2,0 mL/min) e volume de injeção (10,0 e 20,0 µL).

A partir dos cromatogramas obtidos, avaliou-se a adequação do sistema cromatográfico através dos parâmetros: fator de capacidade, número de pratos, fator de assimetria e resolução entre os picos.

4.4.3 Preparação das amostras

As amostras foram pesadas analiticamente, diluídas em balão volumétrico com acetonitrila e sonicadas por 10 min. Retirou-se da amostra uma alíquota volumétrica que foi diluída em solução acetonitrila: água (70:30, v/v) obtendo-se a concentração final de 40 µg/mL. Em seguida, as amostras, foram filtradas em membranas filtrantes de porosidade de 0,22 µm Millipore®.

4.4.4 Preparação da curva controle

Partindo da solução-estoque da NEQ em acetonitrila (250 µg/mL), foram realizadas diluições em fase móvel acetonitrila:água (70:30) para obtenção das seguintes concentrações: 20, 40 e 60 µg/mL. A curva-controle foi preparada diariamente e utilizada para os cálculos das concentrações.

4.4.5 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas definidas a partir do desenvolvimento do método foram: coluna C18, Lichrospher®, (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel

acetonitrila:água (70:30), fluxo de 2 mL/min, detector UV 349 nm, temperatura do forno de 40 ºC e volume de injeção de 10 µL. Como pré-requisito para validação de métodos analíticos, os equipamentos e instrumentos foram qualificados e certificados.

4.4.6 Validação do método analítico

O método foi validado seguindo parâmetros de linearidade, intervalo, robustez, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação de acordo com as normas estabelecidas na International Conference on Harmonization (ICH Q2A e ICH Q2B) e RE 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A confiabilidade dos parâmetros estudados pode ser observada pelo coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. Para os estudos realizados, foi determinado um coeficiente de variação menor que 5% (BRASIL, 2003). Para cada parâmetro avaliado foi realizado análise estatística dos resultados obtidos, segundo Análise de Variância (ANOVA) e teste t Student.

O parâmetro seletividade foi verificado através da comparação do valor obtido pela mesma análise realizada com amostras obtidas com a matéria-prima LPSF/FZ4 e de amostra contaminada com o precursor de síntese LPSF/FZ1, uma vez que o LPSF/FZ1 tem sua estrutura química muito semelhante a NEQ LPSF/FZ4.

A variação média do estudo foi realizada no intervalo de 50 a 150%. Foi preparada uma solução mãe de LPSF/FZ4 em acetonitrila com 10 minutos de agitação por ultrassonicação na concentração de 250 µg/mL. Posteriores diluições volumétricas foram realizadas, utilizando o sistema solvente acetonitrila:água (70:30 v/v) para constituição e análise de três curvas autênticas nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL. Os resultados foram tratados estatisticamente, por cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) é de 0,99.

Já os limites de detecção e de quantificação forma calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (b) das três curvas do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares (a) das respectivas curvas multiplicadas por 3 e 10, respectivamente.

No parâmetros robustez foi analisada a possível influência de pequenas variações ocasionadas pela temperatura do forno (39, 40 e 41ºC) e pelo fluxo (1,9; 2,0; 2,1 mL/min).

A precisão foi avaliada em 2 níveis: repetibilidade (precisão intera-corrida), precisão intermediária (precisão inter-corridas). Na repetibilidade, o método foi verificado por 6 determinações autênticas a 100% da concentração do teste (40 µg/mL), analisadas em um pequeno intervalo de tempo. Na precisão intermediária, foram realizadas análises em 2 dias diferentes com 2 analistas diferentes em triplicata de amostras.

A exatidão do método foi determinado após o estabelecimento da linearidade e do intervalo, sendo verificada a partir de amostras obtidas com a matéria-prima LPSF/FZ4, em triplicata para cada concentração teórica.

PARTE EXPERIMENTAL V

4.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISÔMERO DO LPSF/FZ4

4.5.1 Material

4.5.1.1 Matérias-Primas e reagentes

No desenvolvimento do método analítico foi utilizado o LPSF/FZ4 padrão de trabalho (lote PS01) com pureza de 98%, estimada por DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial), produzidos pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE- Recife, Pernambuco, Brasil).

Água ultra-purificada obtida por Milli-Q Millipore® (Milli-Q® System), etanol (J.T.Baker®), metanol (J.T.Baker®) grau HPLC, foram utilizados como solvente para a preparação das amostras e filtradas em membranas filtrantes de porosidade de 0,22 µm Millipore®. Todos os solventes empregados foram de grau analítico. Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas com certificado de calibração por lote do fabricante Satelit®.

4.5.1.2 Equipamentos

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® equipado com bomba binária LC – 10 ADVP, auto-injetor SIL – 10 ADVP, detector UV SPD – 10 AVP, controlador de sistema SCL – 10 AVP e forno para coluna CTO – 10 ASVP, Balança Analítica

(Bioprecisa®, modelo FA2104N), Ultrassom 1500 (Barson®), forma utilizados no estudo.

4.5.2 Desenvolvimento do Método Analítico

Com os dados de melhor solvente e comprimento de onda, previamente determinados no desenvolvimento do método analítico de doseamento espectrofotometria de UV-Vis, deu-se continuidade ao desenvolvimento do método analítico de doseamento por CLAE-DAD avaliando-se os seguintes parâmetros: temperatra do forno (variando de 25 a 50ºC), fase móvel metanol:água (75:25; 70:30, 60:40), vazão (1,0; 1,2 e 1,5 mL/min) e volume de injeção (10,0 e 20,0 µL).

4.5.3 Preparação das amostras

As amostras foram pesadas analiticamente, diluídas em balão volumétrico com etanol e sonicadas por 10 min. Retirou-se da amostra uma alíquota volumétrica que foi diluída em solução metanol:água (70:30 v/v) obtendo-se a concentração final de 50 µg/mL. Em seguida, as amostras, foram filtradas em membranas filtrantes de porosidade de 0,22 µm Millipore® e colocada em viels.

4.5.4 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas definidas a partir do desenvolvimento do método foram: coluna C18, Lichrospher®, (250 mm x 4,6 mm; partícula 5 µm), fase móvel metanol:água (70:30), fluxo de 1 mL/min, detector UV 349 nm, temperatura do forno de 40ºC e volume de injeção de 20 µL. Como pré-requisito para validação de métodos analíticos, os equipamentos e instrumentos foram qualificados e certificados.

PARTE EXPERIMENTAL VI

4.6 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES

4.6.1 Material

O LPSF/FZ4 (lote 06, teor 97%) com a pureza estimada por DSC, sintetizado pelo LPSF da UFPE.

Para a realização do diagrama de solubilidade foram utilizado os polímeros Polivinilpirrolidona (PVP) K-30 (APSEN®); PEG 4000 (Vetec®); PEG 6000 (USP®); Hidroxipropilmetilcelulose (Methocel K4MCRPR, Colorcon®) e os surfactantes/emulsionantes Polissorbato 80 (Tween 80, Vetec®); Laurilsulfato de Sódio (LSS) (Vetec®) e Monoestearato de Polioxietileno 40 (Myrj 52®) (Spectrum®).

Também foi utilizada água purificada obtida pelo sistema de osmose reversa (Gehaka®) na preparação das amostras para a análise de doseamento.

4.6.2 Diagrama de solubilidade de fases

Para realização do diagrama de fases aplicou-se a metodologia sugerida por Higuchi e Connors (1965) com modificações. O estudo foi realizado em triplicata, à temperatura de 25 ± 2˚C. Em tubos de ensaio de 20 mL adicionou-se excesso do LPSF/FZ4 (~10mg), e posteriormente 5 mL de solução aquosa dos carreadores em concentrações crescentes (0 %, 0.1 %; 0.5 %, 1 %, p/v).

As misturas foram agitadas em banho com água (Banho Dubnoff, Nova Ética®) durante 24 horas. Posteriormente, as suspensões foram filtradas em filtros de nylon com poros de 0.48 μm e quantificadas em espectrofotômetro de UV-Vis (Modelo B582, Micronal®), no comprimento de onda de 346 nm, utilizando o método previamente validado.

4.6.3 Determinação da energia livre de Gibbs

Os valores de energia livre de Gibbs (ΔG˚) foram calculados para cada carreador nas concentrações testadas de acordo com a equação 3:

$$\Delta G = -2.303RT.log\frac{Sc}{S0} \qquad \text{Eq. 3}$$

Onde, **R** é a constante universal dos gases perfeitos (8.314472 J. K^{-1}. mol^{-1}), **T** é a temperatura em Kelvin, **Sc** é a solubilidade do LPSF/FZ4 numa determinada concentração do carreador e **So** é a concentração do LPSF/FZ4 em água na ausência de carreador, ambos em μg/mL.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

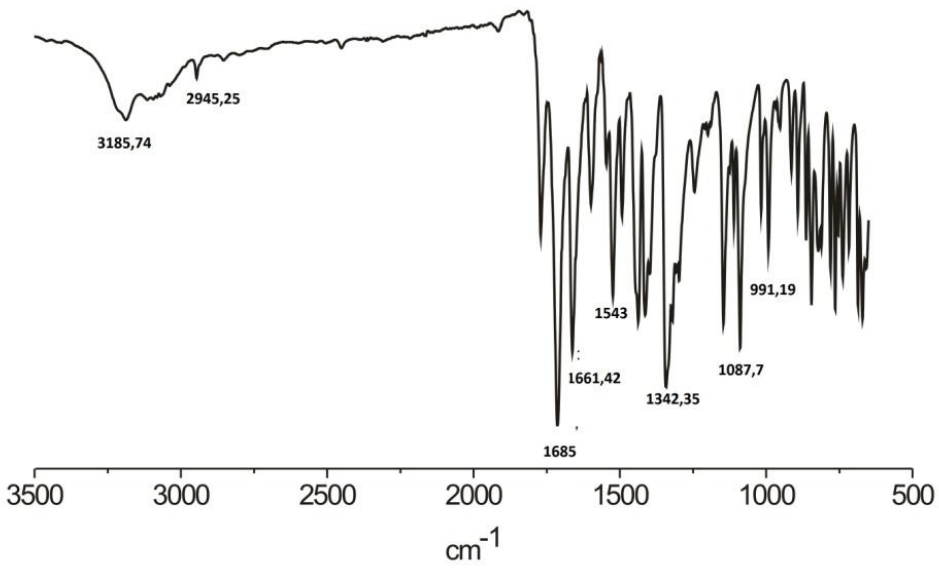
PARTE EXPERIMENTAL I

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NOVA ENTIDADE QUÍMICA: 3-(4-CLORO-BENZIL)-5-(4-NITRO-BENZILIDENO)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA (LFPS/FZ4)

5.1.1 Espectrometria na região no 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 bastante aguda 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 na região do Infravermelho do LPSF/FZ4



Além das bandas de deformação axial de C-H próximos 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 caracterização a presença do grupo NO_2. Observou-se ainda banda característica de N-H em 3185 cm^{-1} .

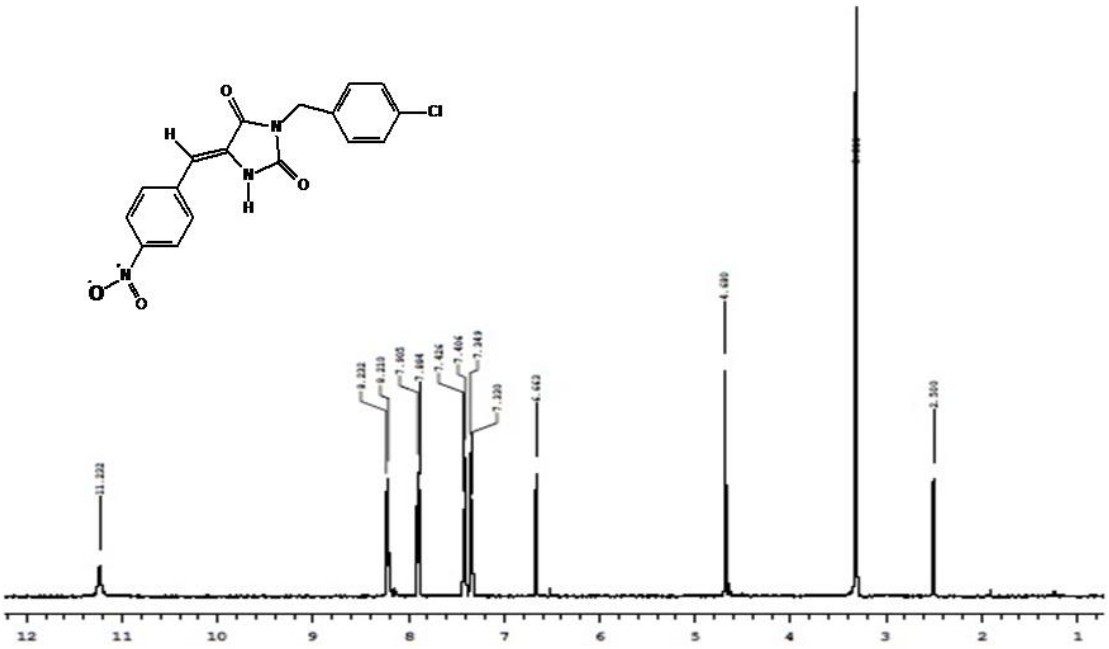
Foi possível observar que as posições das bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de NO_2 ocorreram em 1543 cm^{-1} e 1342 cm^{-1} respectivamente. Devido às interações entre as frequencias de deformação angular fora do plano de NO_2 e do C-H do anel. As bandas de baixa frequencia são de pouca 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 RMN'H, devido a posição dos deslocamentos dos hidrogênios dos mesmos, corroborando a posição *para.*

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN'H)

O espectro de RMN'H do LPSF/FZ4 apresentou um singleto em δ 11, 229 provenientes do proton N-H do anel imidazolina. Os hidrogênios dos aromáticos apresentarm deslocamentos químicos na faixa de δ 7,3 – 8,2 na forma de quatro dubletos, o que confirma a posição *para* dos seus sibstituintes: os prótons observados em campo baixo são referentes ao anel substituido com o grupo nitro devido ao seu efeito mais acentuado de desbilndagem (Figura 4).

Figura 4 – Espectro de RMN’H do LPSF/FZ4



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 da molécula da substância orgânica, 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 tridimencionais precisos e confiáveis (DESCHAMPS., 2010), podendo relacionar estrutura-atividade dos fármacos que são pré-requisitos para o projeto racional de medicamentos (BARREIRO., 1996).

A figura 5 mostra a conformação cristalográfica do LPSF/FZ4 onde descreve a orientação relativa dos três fragmentos planares, o grupo imizalidinônico (A), nitrobenzeno (B) e clorobenzeno (C), representando assim a identidade da molécula, pois apenas ela apresenta-se com essa seqüência de átomos ligados. Os dado cristalográficos estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Figura 5 - Representação ORTEP-3 da molécula do LPSF/FZ4

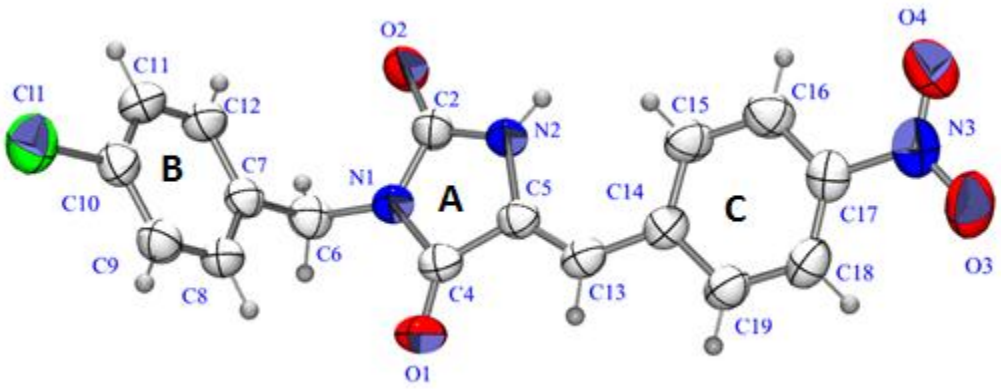


Tabela 2. Distâncias e ângulos das interações de hidrogênio

C15 -H15	C15 ...O2	H15 ...O2	C15 -H15 ...O2 (*)
0.930(3)	3.265(4)	2.403(2)	154.11(2)
N2 -H1	N2 ...O2	H1 ...O2	N2 -H1 ...O2 (*)
0.860(2)	2.841(3)	2.021(2)	158.95(1)
C11 -H11	C11 ...O3	H11 ...O3	C11 -H11 ...O3 (**)
0.930(3)	3.350(5)	2.555(3)	143.78(2)

Operadores de simetria :
(*) (1-x, -y , 1-z)
(**) (x+1/2 , -y+1/2+1 , z-1/2)

Tabela 3. Principais dados cristalográficos da LPSF/FZ4

$C_{17}H_{12}ClN_3O_4$	D_x = 1.499 Mg m^{-3}
M_r = 357.75	F_{000} = 736
Monoclinic, $P2_1/n$	Mo $K\alpha$ radiation λ = 0.71073 Å
a = 17.9881 (9) Å	θ = 1.0–27.5°
b = 4.47660 (10) Å	μ = 0.27 mm^{-1}
c = 19.8120 (10) Å	T = 293 (2) K
β = 96.627 (2)°	9157 reflexões usadas na determinação da cela
V = 1584.71 (12) $Å^3$	0.41 × 0.21 × 0.18 mm
Z = 4	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0.064
3519 reflexões independentes	226 parâmetros refinados
2479 reflexões com $I > 2\sigma(I)$	S = 1.08

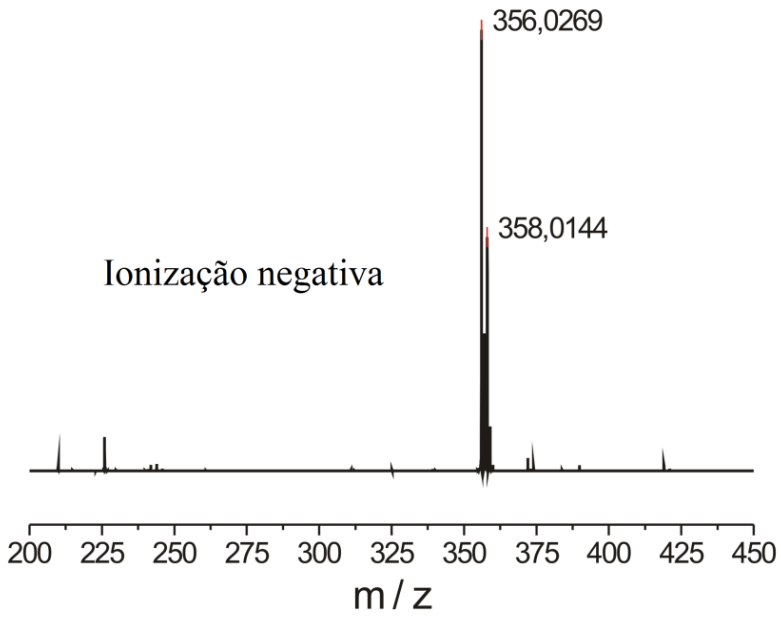
5.1.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

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 absorvância máxima em 346 nm no qual está relacionada com os tipos de ligações da espécie química. A absorvância em 346 nm é atribuída a dois tipos de transições eletrônicas diferentes n-π* e π-π*, correspondentes as carbonilas das amidas e a presença dos grupos funcionais insaturados, respectivamente. A soma destas absorvâncias leva ao aparecimento de regiões de absorção no UV.

5.1.4 Espectrometria de massas (IT-TOF)

A figura 6 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 6- Espectro de massas do LPSF/FZ4



5.1.5 Solubilidade

Aplicando-se a equação $\varepsilon = Abs.M^{-1}$, calculou-se a absortividade molar do LPSF/FZ4 nos diferentes solventes. De acordo com Alves 2010, uma vez realizado o cálculo da absortividade molar do fármaco, pode-se descobrir a concentração molar de qualquer amostra desconhecida solubilizada no solvente em questão. Sendo assim, escolheu-se a absortividade 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 absortividade 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 4) 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.

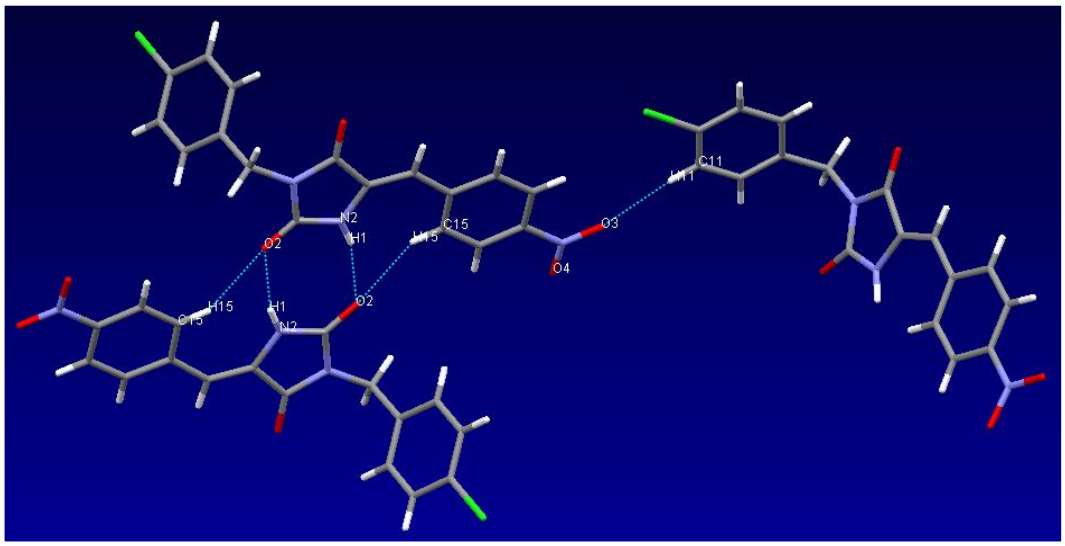
Tabela 4: Resultados experimentais para o estudo de solubilidade quantitativo do LPSF/FZ4

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	

Abs: absorvância; Conc Real: Concentração real; E': absortividade molar

O protótipo não apresenta alta solubilidade aquosa, devido as suas propriedades químicas e estruturais, como mostra a Figura 7**.**

Figura 7- 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 arranjem de forma que os grupos hidrofóbicos das moléculas permaneçam voltadas para fora da rede cristalina, diminuindo sua solubilidade em solventes mais polares.

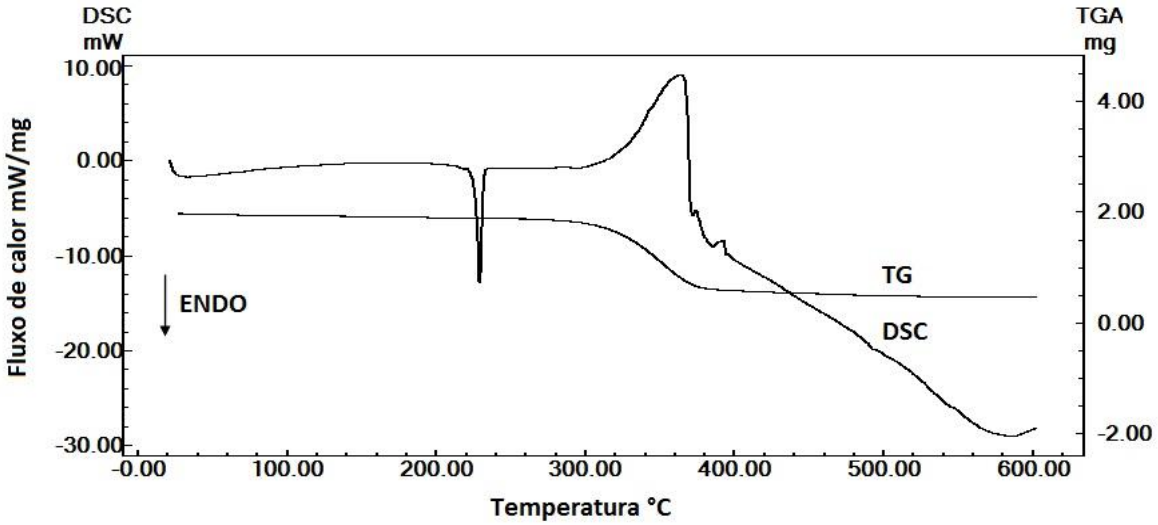
5.1.6 Coeficiente de partição (log P)

O log P de LPSF/FZ4 foi calculado através de um dos sites que permitem esse cálculo, o Laboratório de Química Computacional Virtual (VCCLAB, 2012) e foi obtido um valor de 3, 21. Este valor indica o LPSF/FZ4 é muito solúvel em lípideos (log P> 3) (Aulton, 2005).

5.1.7 Análise térmica

A curva de DSC realizada para a verificação da faixa de fusão do LPSF/FZ4 (Figura 8) na razão de 10°C.min^{-1} evidenciou um pico endotérmico correspondente a temperatura de fusão de 230°C (± 2°C) com um consumo de energia de 175 ± 5 J.g^{-1} e um pico exotérmico em 362°C correspondente a degradação, que foi confirmado pelo curva TG. O evidente e elevado ponto de fusão e elevada energia envolvida no processo, corroboram com o fato da estrutura do LPSF/FZ4 ser cristalina e seus retículos serem mantidos por fortes forças intermoleculares, como mostra a figura supracitada. A curva TG apresentou uma única etapa de decomposição em um intervalo de temperatura entre 320 e 370°C (± 2°C) com 60% (±3 %) de perda de massa, demonstrando um comportamento térmico estável até 320ºC.

Figura 8 - Curvas TG e DSC do LPSF/FZ4 obtidas a 10ºC/min, com massa de 3 mg, sob atmosfera de N_2 em fluxo de 50 mL/min

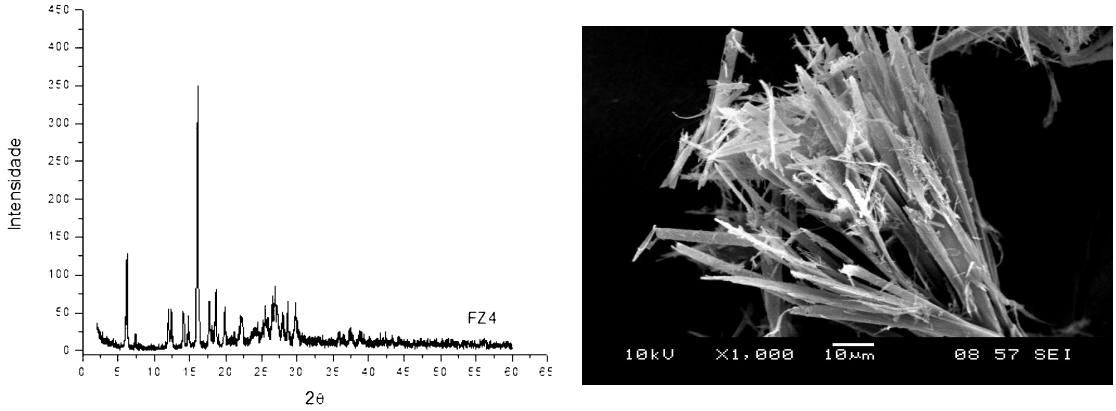


A pureza do LPSF/FZ4 foi calculada em triplicata através da aplicação da equação de Van't Hoff na linearização do evento de fusão, através do desvio da linearidade do mesmo, o qual ocorre pela presença de impurezas. Conhecendo-se o desvio da linearidade, pode-se inferir sobre o fator de correção na linearização da reta. Logo, a pureza do LPSF/FZ4 mostrou-se em torno de 98,22 % (± 0,03%), com um fator de correção calculado para as impurezas de 17,12%.

5.1.8 Difração de raios X e MEV

O perfil difractométrico do fármaco revela a presença de 2 picos de maior intensidade em 6,1 e 16,01° 2θ, 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 9), podendo-se observar a morfologia estrutural, onde as partículas se apresentaram sob forma de agulha, o que representa um estado cristalino do fármaco.

Figura 9- Difratograma de Raios-X e Fotomicrografias do LPSF/FZ4

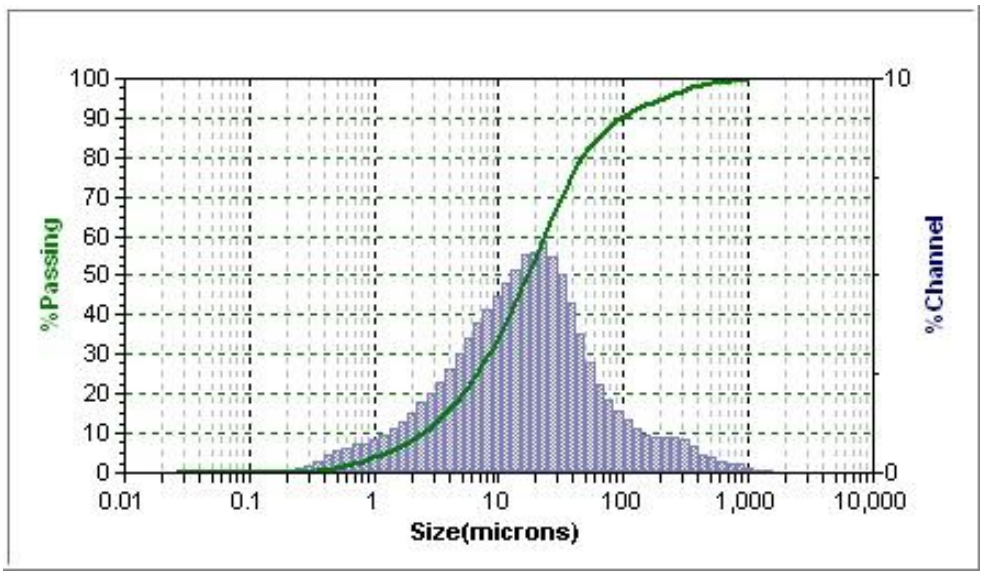


Diante do fato de que o formato cristalino do fármaco influencia na solubilidade e velocidade de dissolução (NERY et al., 2008) isso confirma que LPSF/FZ4 apresenta baixa solubilidade em água, o que justifica em Guedes et al. (2008) a tentativa de aumentar a solubilidade e melhorar a biodisponibilidade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

5.1.9 Granulometria a laser e Área superficial especifica

O gráfico de distribuição granulométrica do LPSF/FZ4 está apresentado na Figura 10, 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.

Figura 10- 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 passou pelo processo de liofilização que diminuiu o tamanho de partícula, como mostrou a figura supracitada, bem como resultou no aumento da área superficial que ficou em torno de 5.2277 m^2/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, consequentemente na dissolução e biodisponibilidade de uma forma farmacêutica (GUIMARÃES et al., 2010).

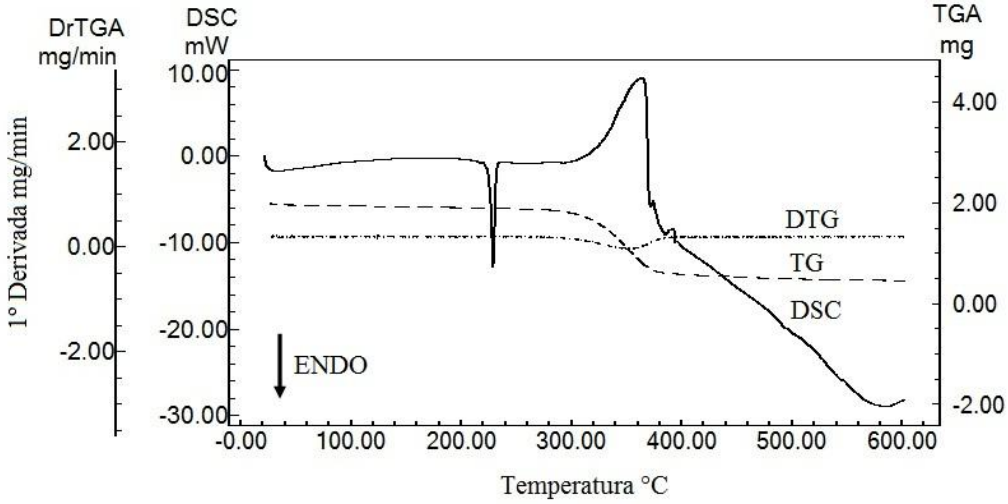
PARTE EXPERIMENTAL II

5.2 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO LPSF/FZ4 COM DIFERENTES EXCIPIENTES E CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS

5.2.1 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 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 ocorreu em uma fase na faixa de temperatura entre 323 e 370°C, com perda de massa de 60,85% seguido por carbonização (Figura 11).

Figura 11- DSC e TG / DTG do LPSF/FZ4 obtidos em atmosfera de dinâmica do nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 ° C/min



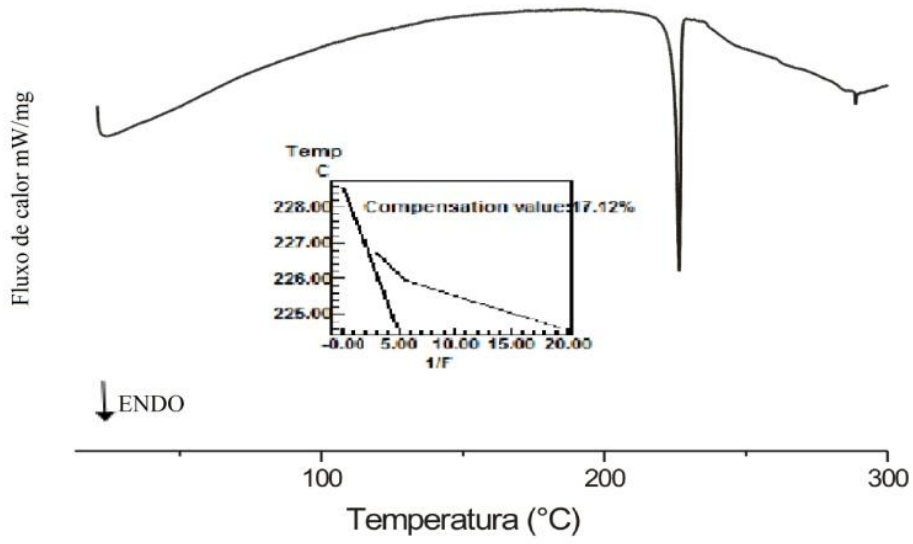
5.2.2 Determinação da pureza

Devido ao LPSF/FZ4 ser até o momento um protótipo, e não possuir SQR 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 (ICTAC, 2012). Logo, a pureza média do LPSF/FZ4 por DSC mostrou-se em torno de 98,24% ± 0,03.

Na Figura 12 observa-se um gráfico denominado 1/F (T x 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 intersecção 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 12- Curva DSC do LPSF/FZ4 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



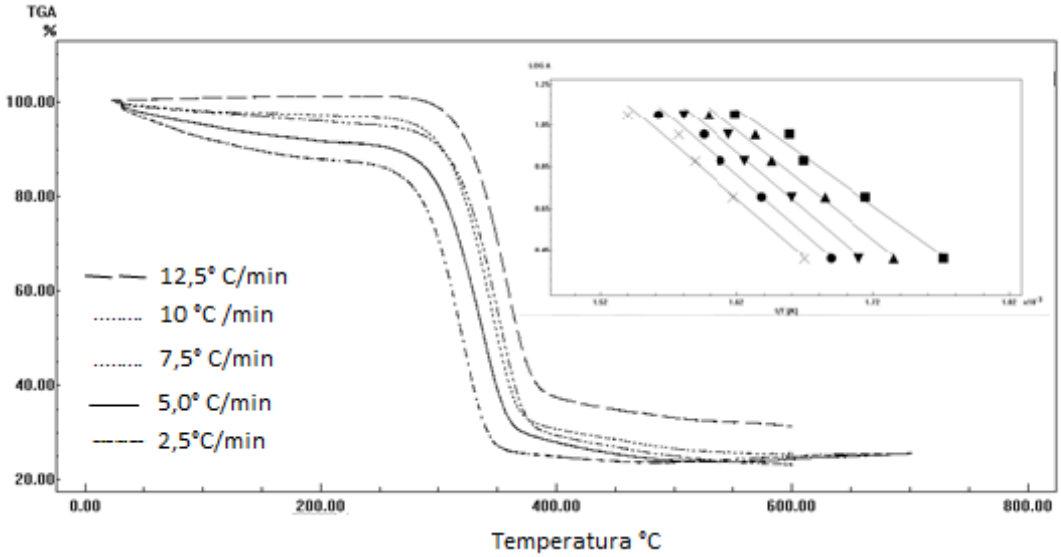
5.2.3 Estudo cinético de termo decomposição do LPSF/FZ4

Há duas maneiras de conseguir os parametros cinéticos: através do método convencional de estudo isotérmico por TG, que utiliza a equação de Arrhenius para determinar estes parâmetros cinéticos e o estudo não isotermico 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 pela plotagem da perda de massa versus temperatura de cinco curvas TG em diferentes razões de aquecimento (Figura 13). Foi utilizado o método de Ozawa, baseando-se 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: Ea (energia de ativação) 98,22 kJ/mol, A (fator de frequencia) 5,28 x10^{7} min^{-1} e ordem de reação 1,0.

Figura 13- Curvas TG e o gráfico de Ozawa do LPSF/FZ4 obtido nas razões de aquecimento de 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 12,5 ºC/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio no método não-isotérmico



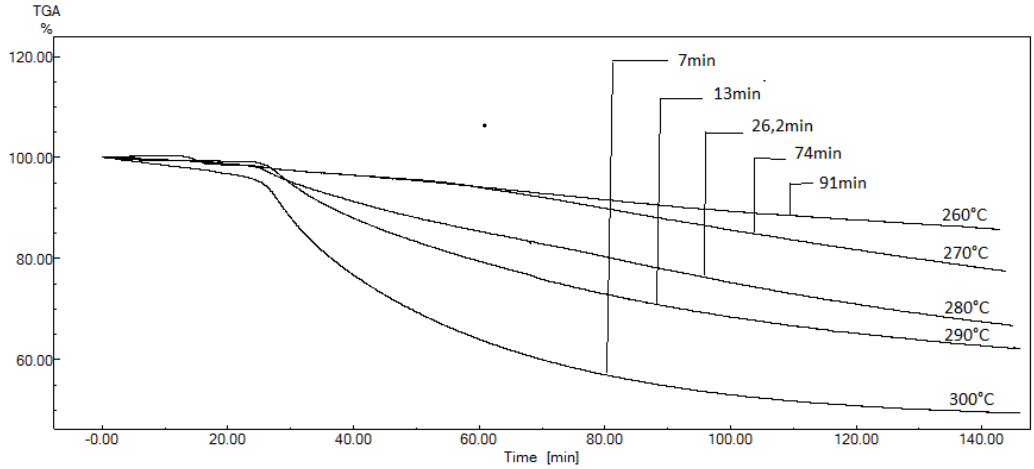
O gráfico de Ozawa demonstra uma boa correlação linear entre as cinco razões de aquecimento (FELIX; CIDES DA SILVA; MATOS, 2009). As cinco curvas TG indicam que a perda de massa entre 250 e 400°C, ocorreu em uma única etapa, o que corrobora com a ordem de reação assumida de primeira ordem, uma vez que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

O método isotérmico usa comumente a mesma taxa 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 14) 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 Figuras 14 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 estas temperaturas sob uma

atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) por um tempo suficiente para a perda de massa em pelo menos 10%. Estas curvas mostram o aumento da velocidade do processo de termodecomposição evidenciado através das constantes.

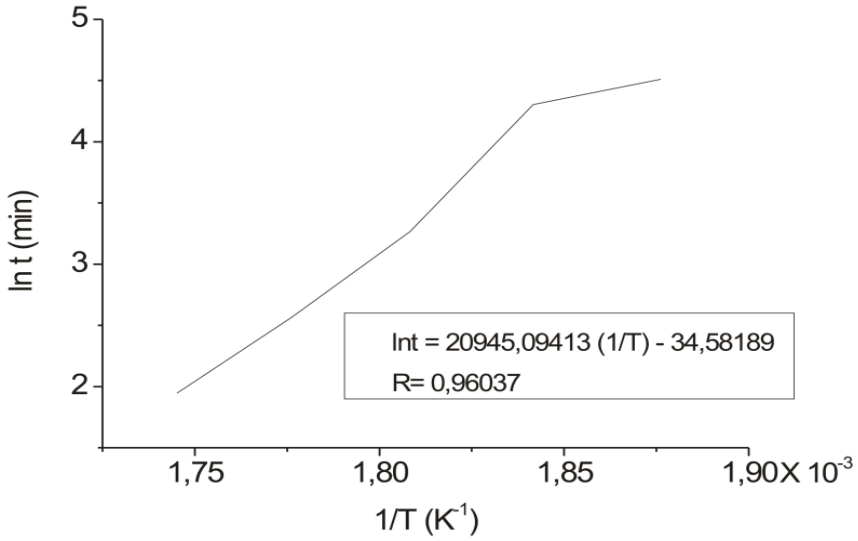
Figura 14- Curvas isotérmicas do LPSF/ FZ4 nas temperaturas 260, 270, 280, 290 e 300ºC na atmosfera de N_2 (50 mL/min)



Estas curvas foram utilizadas para obter o gráfico de *lnt vs* a recíproca da temperatura 1/T (K^{-1}) para o LPSF/FZ4 (Figura 15) 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, menssurar a linearidade e o coeficinete de correlação (r) (RODRIGUES et al., 2005). O valor da energia de ativação para o LPSF/FZ4 foi de 174,13 KJ mol^{-1}, calculada a partir do produto do coeficiente angular da inclinação da reta com a constante geral dos grases R (8,314 J mol^{-1} K^{-1}).

Calculou-se a estabilidade (em dias) com base na equação de Arrehenius, utilizando 25°C como padrão de temperatura ambiente. O resultado foi um tempo estimado de estabilidade térmica de 132 dias, ou seja, aproximadamente 4 meses para um decaimento de 10% de massa, indicando que esta NEQ é instável.

Figura 15- Gráfico de Arrhenius, ln t vs 1 / T, para a decomposição térmica das amostras de LPSF/FZ4



5.2.4 Estudo de compatibilidade

Amostras binárias de LPSF/FZ4: excipiente na proporcão de 1:1 p/p forma colocados em recipientes de vidro âmbar para dar peso composto de 60 mg. Foram adicionadas 3 mg da mistura binária no porta-amostra de alumínio hermeticamente fechada do DSC e submetidas as mesmas condições descritas anteriormente.

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 5.

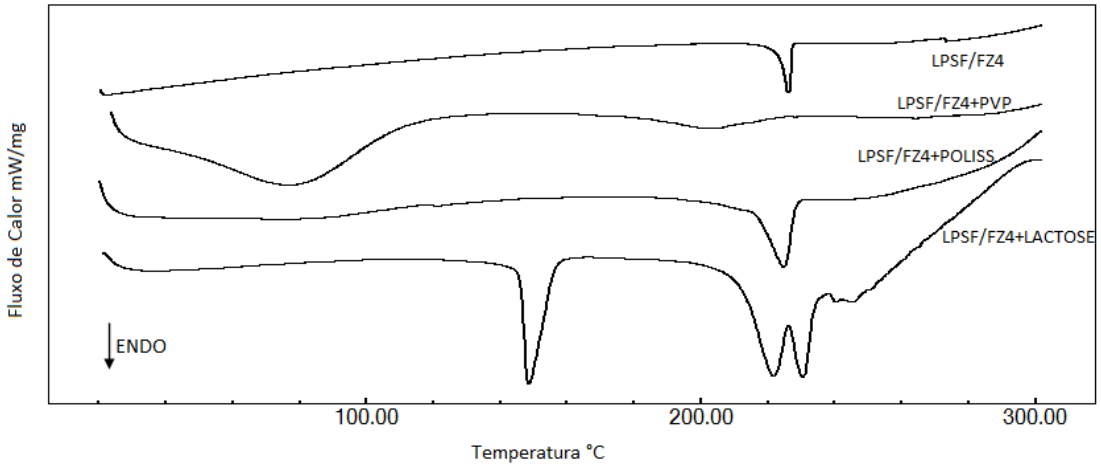
Tabela 5: Dados termoanalíticos do LPSF/FZ4 e das misturas binárias com excipientes

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 7), isso é indicativo de uma forte interação, mas não necessariamente correspondente a incompatibilidade. O comportamento da mistura evidencia a missibilidade 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.

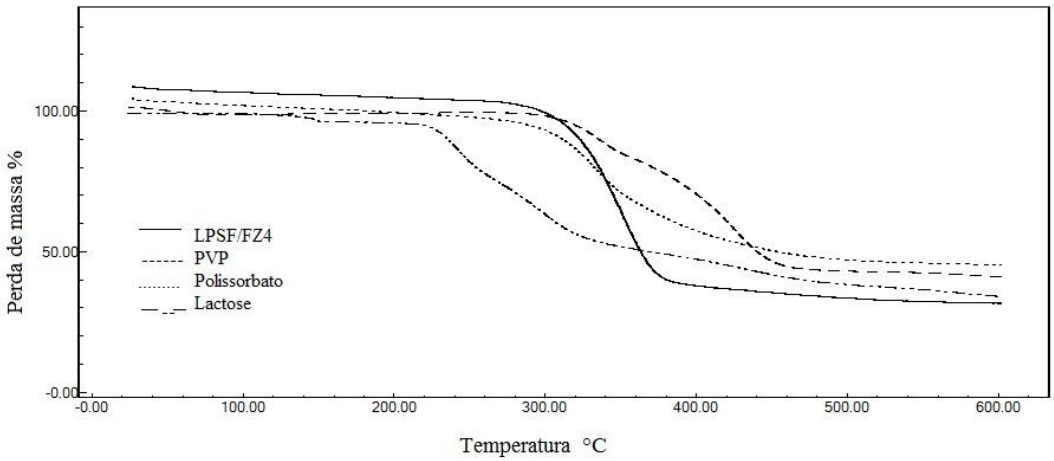
Na curva DSC da mistura binária de LPSF/FZ4:Polissorbato (Figura 16), houve uma queda considerável da temperatura de fusão de mais de 10°C do inicio da temperatura de fusão do protótipo, que pode ser indicativo de ocorrencia de interação protótipo-excipiente. De acordo com as curvas TG/DTG (Figura 17) o inicio da temperatura de decomposição diminuiu de 323 para 313°C.

Figura 16- Curvas DSC do LPSF/FZ4 e excipientes obtidos em atmosfera dinamica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento 10°C/min



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 da 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 15) revelou interações entre o protótipo e a lactose, que pode ser de natureza física. Este fato é justificado porque a curva TG (Figura 16) mostrou a antecipação da temperatura de decomposição térmica em torno de 40°C abaixo da degradação do protótipo. 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).

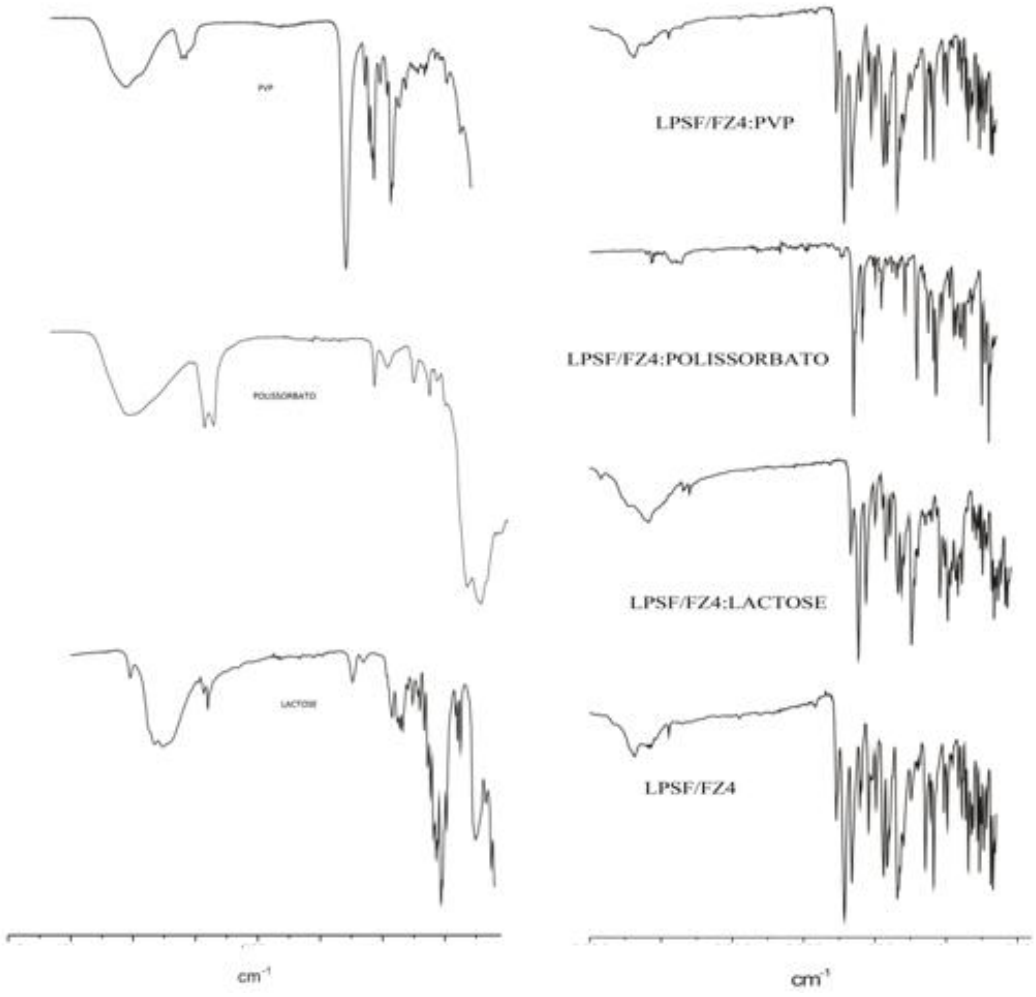
Figura 17- Curvas TG do LPSF/FZ4 e excipientes obtidos em atmosfera dinamica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento 10°C/min



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

A Figura 18 mostra os espectros IV do LPSF/FZ4 e da mistura física LPSF/FZ4:Polissorbato, a mesma mostra a presença de bandas caracteristicas correspondentes ao protótipo e ao excipiente. Não ocorreu aprarecimento e desaparecimento de novas bandas, nem alteração na intensidade das bandas no espectro, confirmando ausência de mudança na estrutura do protótipo (TITA et al., 2011). Resultado similar também pode ser observado para a mistura fisica LPSF/FZ4:Lactose.

Figura 18 - Espectro na região do IV das misturas físicas 1:1 LPSF/FZ4 com Lactose, PVP e Polissorbato 80



As figuras 19 e 20 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, representando na Figura 19 a correlação entre a perda de massa e temperatura, bem como, com os dados do experimento e a partir do método de regressão linear, que foi construído o gráfico de Arrhenius (Figura 20).

Figura 19- Curvas isotérmicas da mistura física 1:1 entre LPSF/ FZ4 e lactose em diferentes temperaturas na atmosfera de N_2 (50 mL/min)

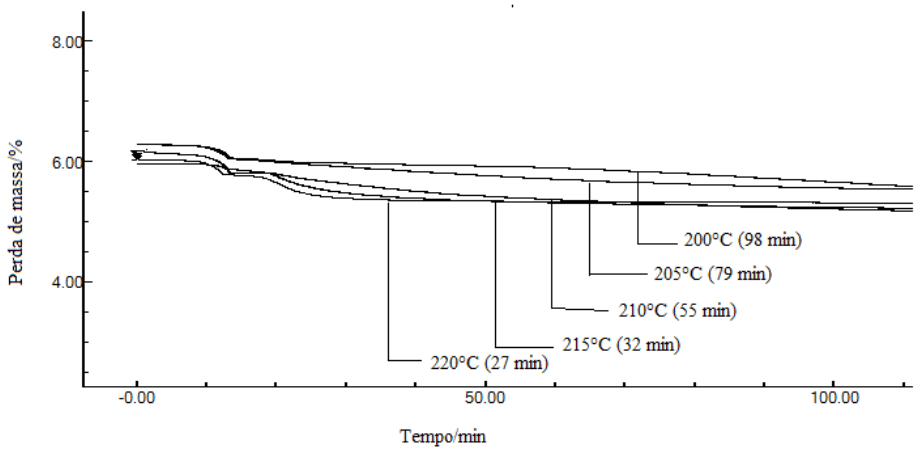
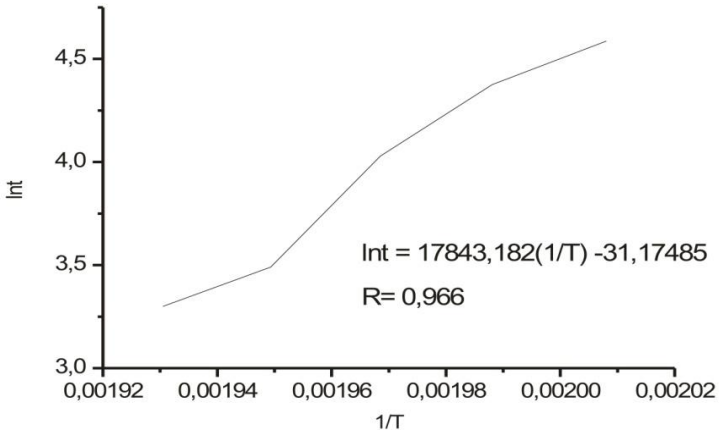


Figura 20 - Gráfico de Arrhenius, ln t vs 1 / T, para a decomposição da mistura física 1:1 entre LPSF/FZ4 e lactose



A superposição das curvas TG obtidas em diferentes razões de aquecimento (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5°C/min) para a cinética de decomposição sob condições não isotermicas (método de Ozawa) para a degradação do LPSF/FZ4 e lactose são

mostradas na Figura 21. A Tabela 6 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 21 - 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

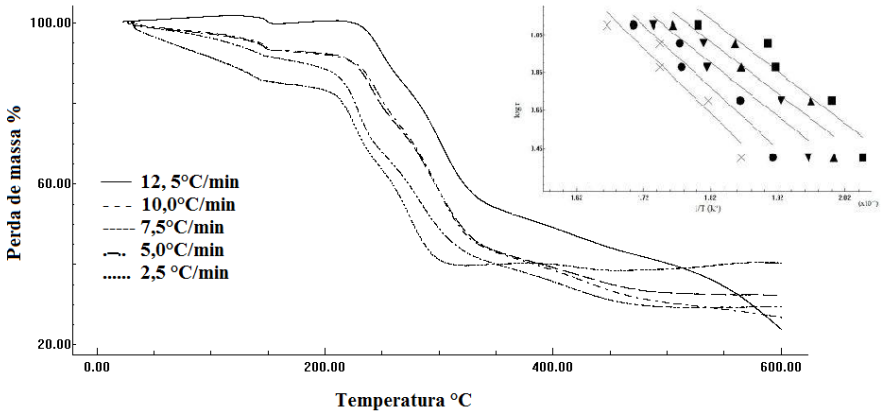


Tabela 6: Parâmentros cinéticos obtidos pelo método nao isotérmico e Energia de ativação

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 (98,22 kJ.mol^{-1}), da mesma forma também pôde-se observar para o estudo isotermico (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 analise termica e espectroscopia na região do IV (SALVIO-NETO; MATOS., 2011).

PARTE EXPERIMENTAL III

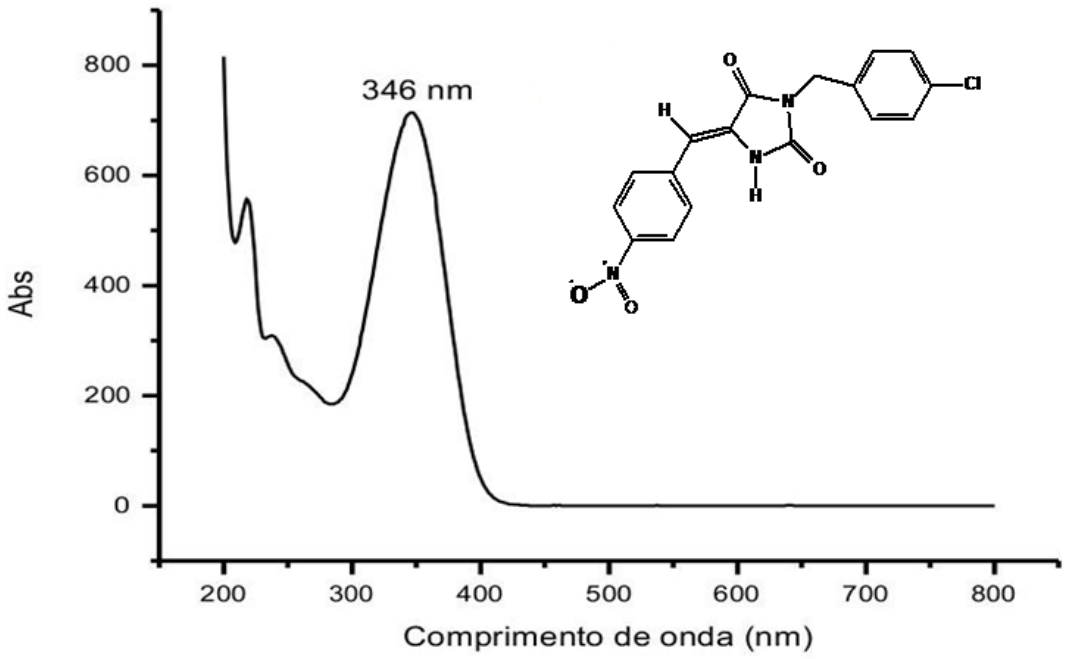
5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS DO LPSF/FZ4

5.3.1 Desenvolvimento do método analítico

Conforme avaliação da solubilidade da NEQ, observou-se que esta apresenta-se solúvel nos solventes testados - acetonitrila, metanol e etanol. Para a acetonitrila a NEQ mostrou-se facilmente solúvel, enquanto que para os solventes metanol e etanol a NEQ apresentou mais dificuldade em ser solubilizado além de formar facilmente precipitado após algumas horas de preparação da amostra. Estes resultados fornecem informações importantes do comportamento da NEQ, o que possibilitou a escolha inicial do solvente mais adequado para completa solubilização do LPSF/FZ4 e que permita também a máxima estabilidade da solução a fim de proporcionar a quantificação adequada da NEQ. Após a escolha do solvente, foram realizadas varreduras utilizando concentrações diferentes de acetonitrila:água a fim de compor a solução diluente. A proporção deste sistema (35:65, 40:60 e 45:55) foi determinada de acordo com a estabilidade do LPSF/FZ4 em permanecer solúvel por 24 h em repouso após completa solubilização.

As varreduras espectrofotométricas realizadas para verificação dos sistemas que apresentavam as melhores absortividades na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm demonstraram que todos os sistemas testados apresentam absortividade próximo a 346 nm. Diante disto, utilizaram-se os critérios toxicidade e estabilidade, além da proporção maior de água no sistema, o que facilita as leituras provenientes de estudos de preparações de dispersões sólidas e ensaios de dissolução, logo optando-se pelo sistema de diluição acetonitrila:água (35:65 v/v) (Figura 22).

Figura 22- Estrutura química do LPSF/FZ4 e varredura espectrofotométrica no sistema solvente selecionado acetonitrila:água (35:65 v/v)



De acordo com as análises efetuadas para determinação do tempo de agitação na preparação das amostras, foi possível definir ultrassonicação por 10 minutos, a ser padronizado, uma vez que este se apresentou como o mais eficiente para o método proposto (Tabela 7). Como houve diferença estatística significante a nível de 95% de confiança entre os tempos de sonicação (5, 10 e 15 min), avaliou-se o CV% para escolha do melhor tempo de sonicação, sendo o menor CV% o do tempo de 10 minutos.

Tabela 7: Resultados experimentais do desenvolvimento do método espectrofotométrico em relação a tempo de ultrassonicação, com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se a ANOVA One-way

Tempo de Sonicação (min)	**Amostra 1 (Abs)**	**Amostra 2 (Abs)**	**Amostra 3 (Abs)**	**Média**	**CV%**
5	0,435	0,439	0,438	0,437	0,47
10	0,457	0,460	0,458	0,458	0,33
15	0,453	0,450	0,449	0,450	0,46
		F calculado = 92,3939		F tabelado = 5,1432	

5.3.2 Validação do método analítico

5.3.2.5 Especificidade

Os resultados de exatidão do método evidenciaram uma concordância entre os valores de absorvância das médias obtidas para a matéria-prima pura e para matéria-prima contaminada (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados da Especificidade do método

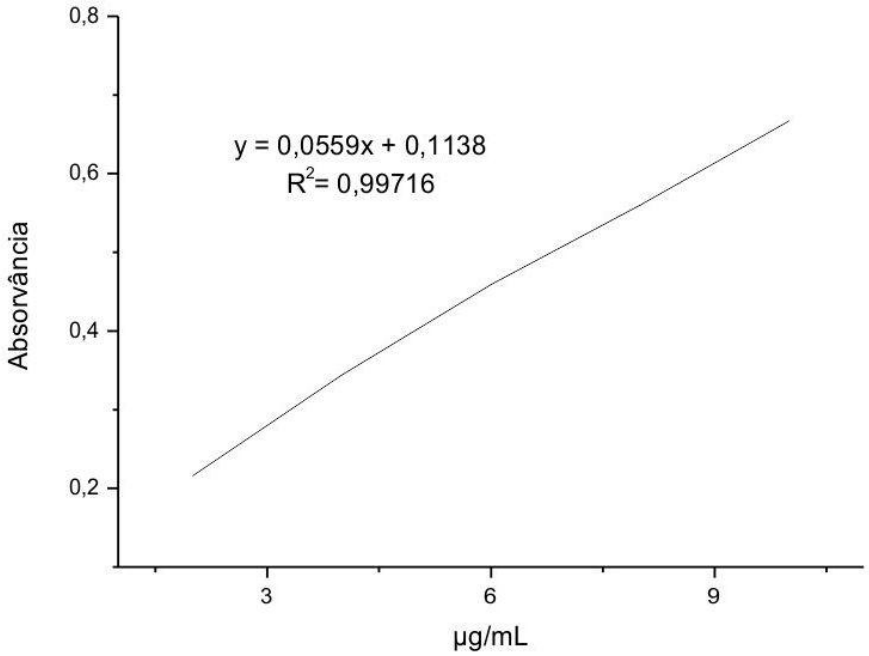
Amostras	**Sem contaminante**	**Com contaminante**
	[ ]%	**[ ]%**
1	94,55	108,71
2	95,64	101,74
3	103,70	100,87
Média	97,96	103,77
DP	4,998	4,298
CV%	0,051	0,041

A análise estatística através do teste *t* de Student comprovou a similaridade dos resultados em um intervalo de confiança de 95%. O resultado mostra que o *t* calculado (0,358) é menor que o *t* tabelado (4,302).

5.3.2.1 Linearidade e Intervalo

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação linear 0.9972, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta y = 0,0559 (± 0,00149) x + 0,1138 (±0,00988) (figura 23).

Figura 23- Gráfico de linearidade do método desenvolvido



5.3.2.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

De acordo com as estimativas dos limites de detecção e quantificação, o método apresentou sensibilidade para identificar e quantificar o LPSF/FZ4, diferenciando as leituras dos ruídos do equipamento, com valores 0,106 µg/mL e 0,354 µg/mL para os limites de detecção e limite de quantificação, respectivamente.

5.3.2.3 Robustez

Para os parâmetros tempo de agitação, verificou-se estatisticamente através da ANOVA One-Way, presumindo variâncias equivalentes, que não há diferença significativa entre os resultados admitindo-se um nível de 95% de confiança entre a média das concentrações, apresentando o F calculado de 0,135 e um F crítico de 5,143. Para o parâmetro marca do solvente utilizado, verificou-se estatisticamente através do Teste *t* Student, presumindo equivalência entre as médias, que não há diferença significativa entre os resultados admitidos a um nível de 95% de confiança entre as médias das concentrações, apresentando o *t* calculado de 0,645 e um *t* crítico de 4,302.

5.3.2.4 Precisão

O método desenvolvido mostrou ser preciso nos três níveis avaliados, repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Na repetibilidade, os resultados obtidos apresentam um desvio padrão de 0,008 e coeficiente de variação de 0,018%, abaixo do valor máximo especificado (BRASIL, 2003).

Na precisão intermediária, foi provado que o método é preciso para análises feitas por analistas diferentes dentro de um mesmo dia e em dias diferentes, pois através do tratamento estatístico utilizando ANOVA One-Way com probabilidade estatística de $p<0,05$ os F calculados para as análises foram menores do que o F crítico (Tabela 9).

Tabela 9: Dados da Precisão Intermediária para o método espectrometrico

Analista	**Dia I**	**Dia II**	
Analista 1	99,419	107,189	Test F dia
Analista 2	103,195	101,452	F calculado dia = 1,238
			F crítico = 9,552
Média quadrática dia = 51,412			Test F analista
Média quadrática analista = 13,099			F calculado analista = 1,491
			F crítico = 9,552

O método foi reprodutivo quando avaliado em laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes. Os resultados avaliados podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados experimentais obtidos para a reprodutibilidade

Laboratório	**1**	**2**	**3**	**Média**	**CV%**	
I	94,55	95,64	100,00	96,73	2,979	F calculado = 3,1558
II	100,87	103,05	98,03	100,65	2,496	F tabelado = 7,7086

5.3.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi averiguada através da análise de três concentrações distintas (33, 100 e 166%), encontrando-se os resultados dentro dos limites especificados (Tabela 11).

Tabela 11: Dados referente a Exatidão do método

Amostras	2 µg/mL	%	6 µg/mL	%	10 µg/mL	%
1	2,15	107,84	5,90	98,47	9,830	98,30
2	2,27	113,72	5,86	97,82	9,777	97,77
3	2,16	108,49	6,22	103,70	9,686	96,86
Média	2,20	110,02	6,00	100,00	9,76	97,64
DP	0,064	3,224	0,193	3,224	0,072	0,727
CV%	2,930	2,930	3,224	3,224	0,745	0,745

Para este parâmetro, foi aplicado o teste *t* Student, o qual demonstrou que o *t* calculado para cada concentração foi de 0.0057, 1.00 e 0.0049, respectivamente, sendo estes menores que o *t* tabelado (2.776), comprovando que não houve diferença significativa entre as três concentrações analisadas.

PARTE EXPERIMENTAL IV

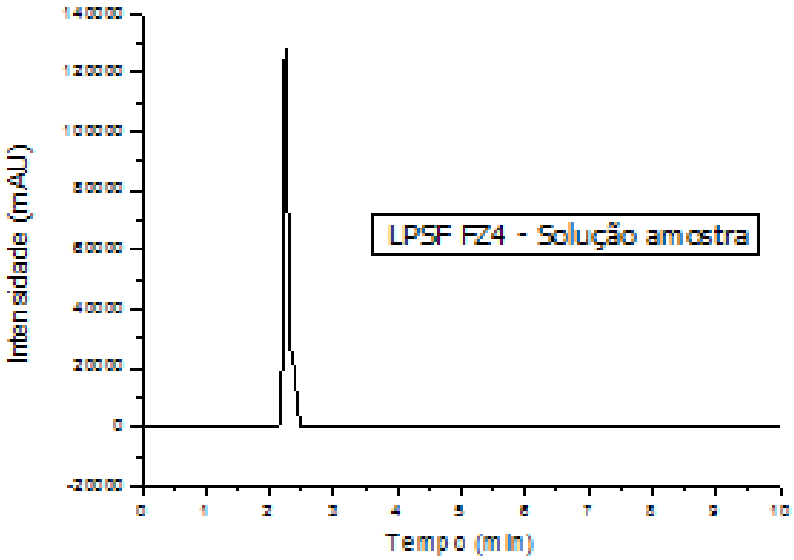
5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD) DO LPSF/FZ4

5.4.1 Desenvolvimento do Método Analítico

Após avaliação dos resultados preliminares, onde se considerou a resolução do pico e o tempo de retenção, a fase móvel selecionada foi composta por acetonitrila:água na proporção de 70:30, com fase estacionária, coluna C18, Lichrospher, 250 mm x 4,6 mm; partícula 5 µm, justificando uma melhor resolução devido a ter a sílica modificada com o grupamento octadecil, visto que o composto hidrofóbico se apresenta com tendência a ficar mais retido (FARIA, et al., 2006).

Após testar diferentes temperaturas para o forno (25 a 80ºC) foi verificado que, para este método, a temperatura influenciou na resolução do pico, sendo a temperatura de 40ºC a que se apresentou mais adequada. O fluxo e o volume de injeção foram fixados durante o estudo, sendo determinada a vazão de 2 mL/min e o volume de injeção de 10 µL, apresentando cromatograma com tempo de retenção de 2,246 min (Figura 24).

Figura 24 - Cromatograma do LPSF/FZ4 do método cromatográfico desenvolvido



Obteve-se como resultado o número de pratos teóricos de 3179,398; fator de cauda de 1,894 e fator de capacidade 0,000.

5.4.2 Validação do método analítico

5.4.2.1 Especificidade

Como resultado do teste para comprovação da especificidade tem-se um cromatograma para onde contaminamos uma a amostra de LPSF/FZ4 com LPSF/FZ1 e se podendo-se observar, que o pico do LPSF/FZ1 não é visto no comprimento de onda que o método analítico foi desenvolvido, 349 nm. O LPSF/FZ1 só é detectado quando se utiliza o comprimento de onda de 220 nm, no entanto o seu tempo de retenção não sobrepõe o tempo de retenção do LPSF/FZ4 (figuras 25 e 26).

Figura 25 - Cromatograma de análise da amostra de LPSF/FZ4 associada ao LPSF/FZ1 - parâmetro e especificidade

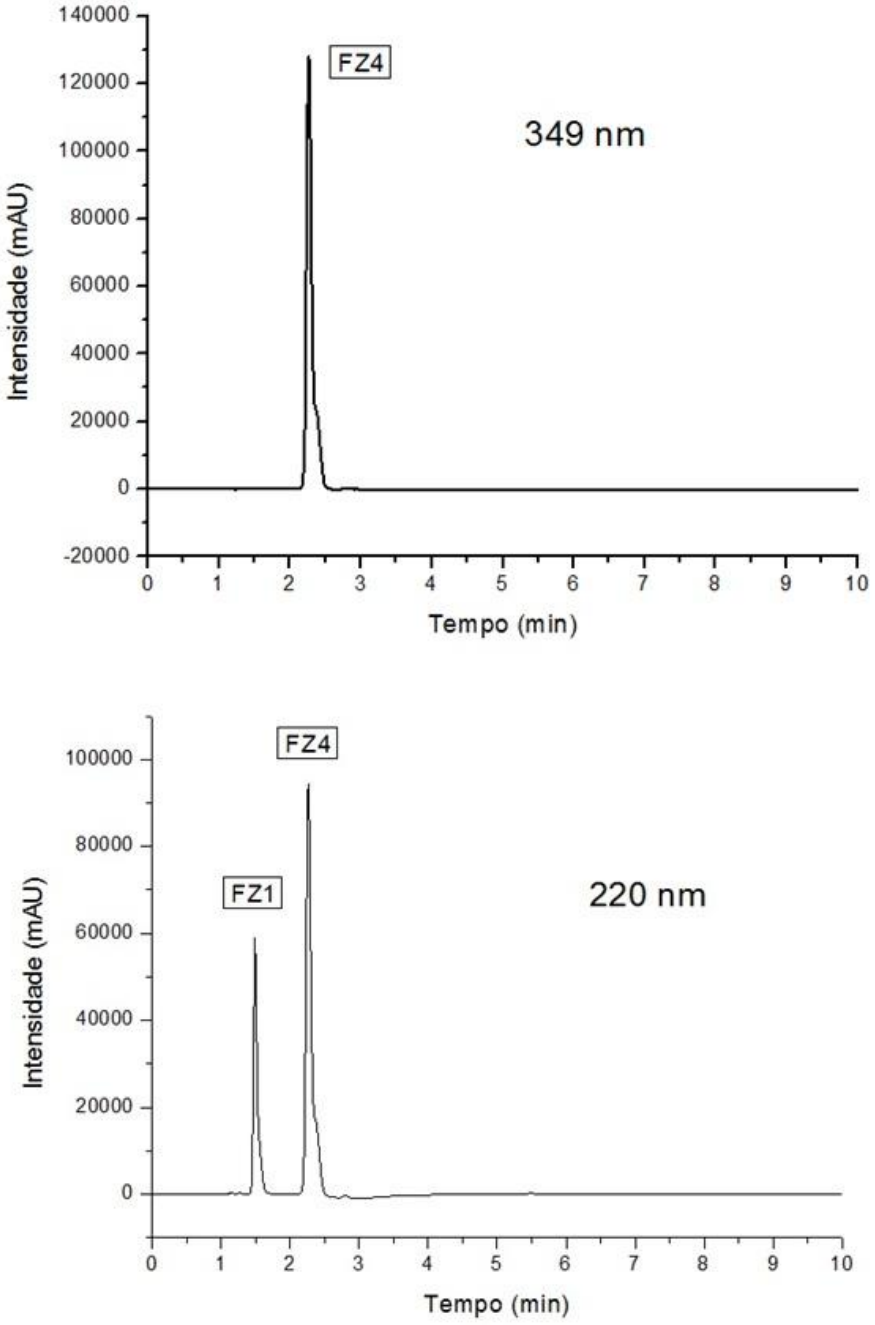
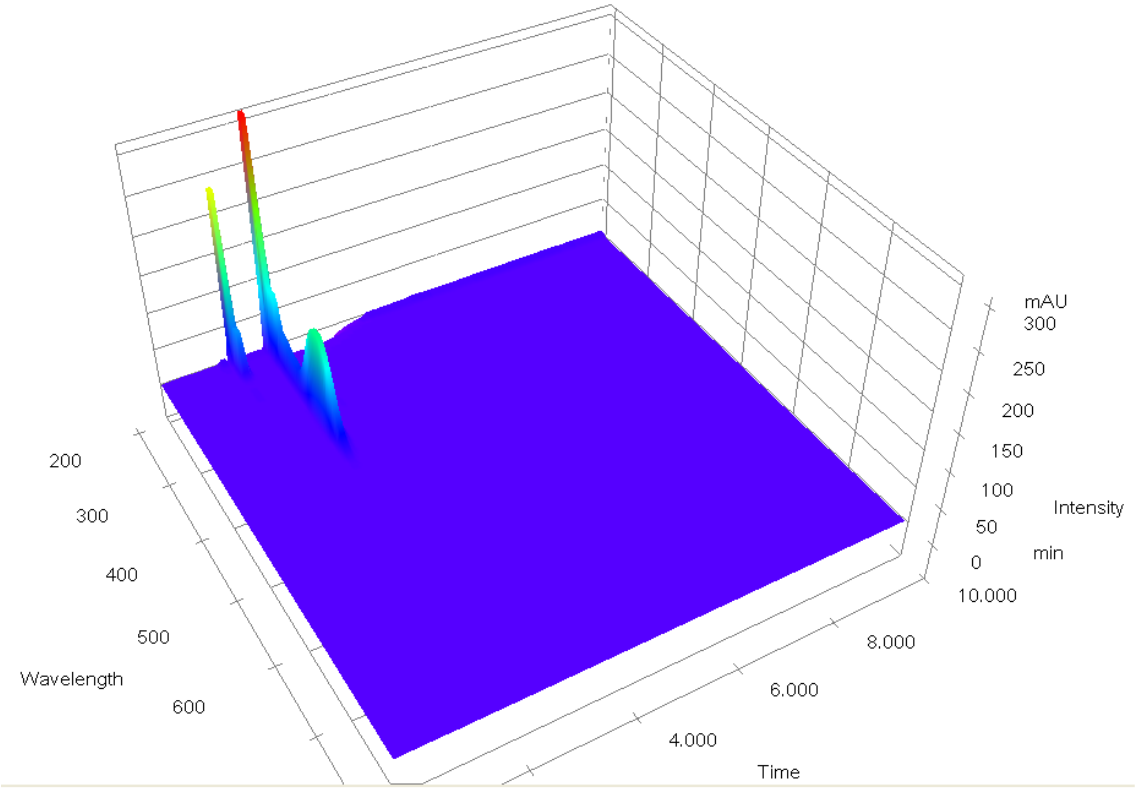


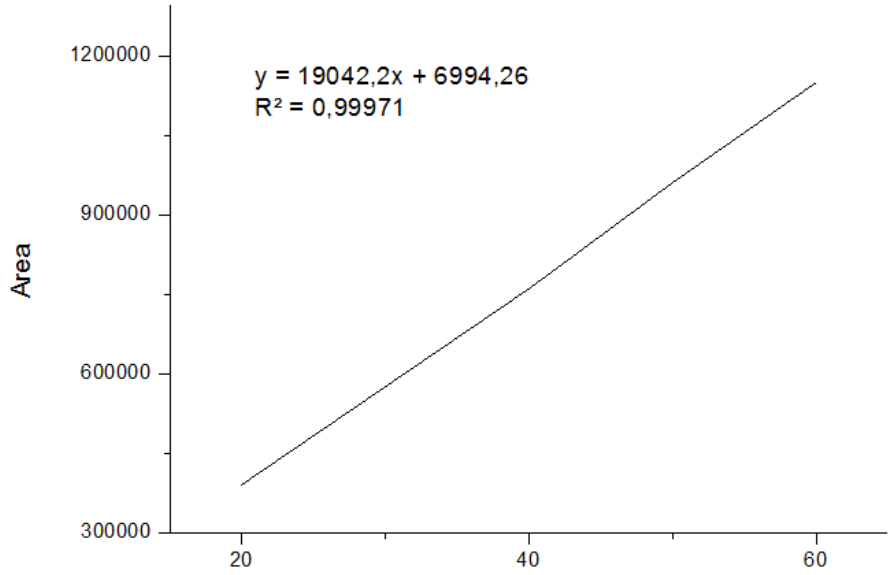
Figura 26 - Cromatograma em 3D de análise da amostra de LPSF/FZ4 associada ao LPSF/FZ1 - parâmetro e especificidade



5.4.2.2 Linearidade

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação linear 0,9997, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta y = 19042,2 (±161,7) x + 6994,26 (±6861,6) (figura 27).

Figura 27 - Gráfico de linearidade do método desenvolvido



5.4.2.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

De acordo com as estimativas dos limites de detecção e quantificação o método apresentou sensibilidade para identificar e quantificar o LPSF/FZ4, diferenciando as leituras dos ruídos do equipamento, com valores 0,006 µg/mL e 0,022 µg/mL para o limite de detecção e limite de quantificação, respectivamente.

5.4.2.4 Robustez

Para o parâmetro tempo do forno, verificou-se estatisticamente através da ANOVA One-Way, presumindo variâncias equivalentes, que não há diferença significativa entre os resultados admitindo-se um nível de 95% de confiança entre a média das concentrações, apresentando o F calculado de 0,026 e um F crítico de 5,143. Para o parâmetro fluxo, verificou-se estatisticamente através da ANOVA One-Way, presumindo variâncias equivalentes, que não há diferença significativa entre os resultados admitidos a um nível de 95% de confiança entre as médias das concentrações, apresentando o F calculado de 3,742 e um F crítico de 5,143.

5.4.2.5 Precisão

O método desenvolvido mostrou ser preciso nos dois níveis avaliados, repetibilidade e precisão intermediária.

Na repetibilidade os resultados referentes a sua avaliação estão na tabela 12, em que a ANVISA (BRASIL, 2003) recomenda que o CV% não excedam 5%, assim, os valores encontrados atendem aos limites estabelecidos.

Tabela 12: Repetibilidade do LPSF/FZ4

Amostra	**Área**	**[ ] µg/mL**
1	770955	40,48914
2	771079	40,49565
3	757348	39,77452
4	758153	39,8168
5	763651	40,10555
6	763596	40,10266
Média	764130,3	40,13072
DP	5951,536	0,312564
CV%	0,778864	0,778864

Na precisão intermediária foi provado que o método é preciso para análises feitas por analistas diferentes dentro de um mesmo dia e em dias diferentes (tabela 13), pois através do tratamento estatístico utilizando ANOVA two-way (fator duplo com repetição) em que o F calculado para dias foi 2,9288; para analistas 0,4410 e para a interação dias e analistas o F calculado foi 0,1746; todos inferiores ao Fcrítico de 10,23.

Tabela 13: Dados da Precisão Intermediária

Amostra		**1**	**2**	**3**	**Média**	**DP**	**CV%**
Dia 1	Analista 1	770595	775957	772603	773051,7	2709,01	0,350431
	Analista 2	771627	771706	771594	771642,3	57,55287	0,007458
Dia 2	Analista 1	776816	776798	770595	774736,3	3586,511	0,462933
	Analista 2	774020	774429	774798	774415,7	389,1713	0,050254

5.4.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi averiguada através da análise de três concentrações distintas (50%, 100%, 150%), encontrando-se os resultados dentro dos limites especificados (Tabela 14).

Tabela 14: Dados referente a Exatidão do método

Amostras	20 µg/mL	Área	40 µg/mL	Área	60 µg/mL	Área
1	20,9674	399241	40,4891	770955	60,6490	1154821
2	20,9992	399847	40,5235	771611	59,9279	1141089
3	20,9831	399541	40,5694	772485	60,3201	1148558
Média	20,9832	399543	40,5274	771683,7	60,2990	1148156
DP	0,0159	303,005	0,0403	767,5841	0,3610	6874,821
CV%	0,0758	0,0758	0,0994	0,0994	0,5987	0,5987

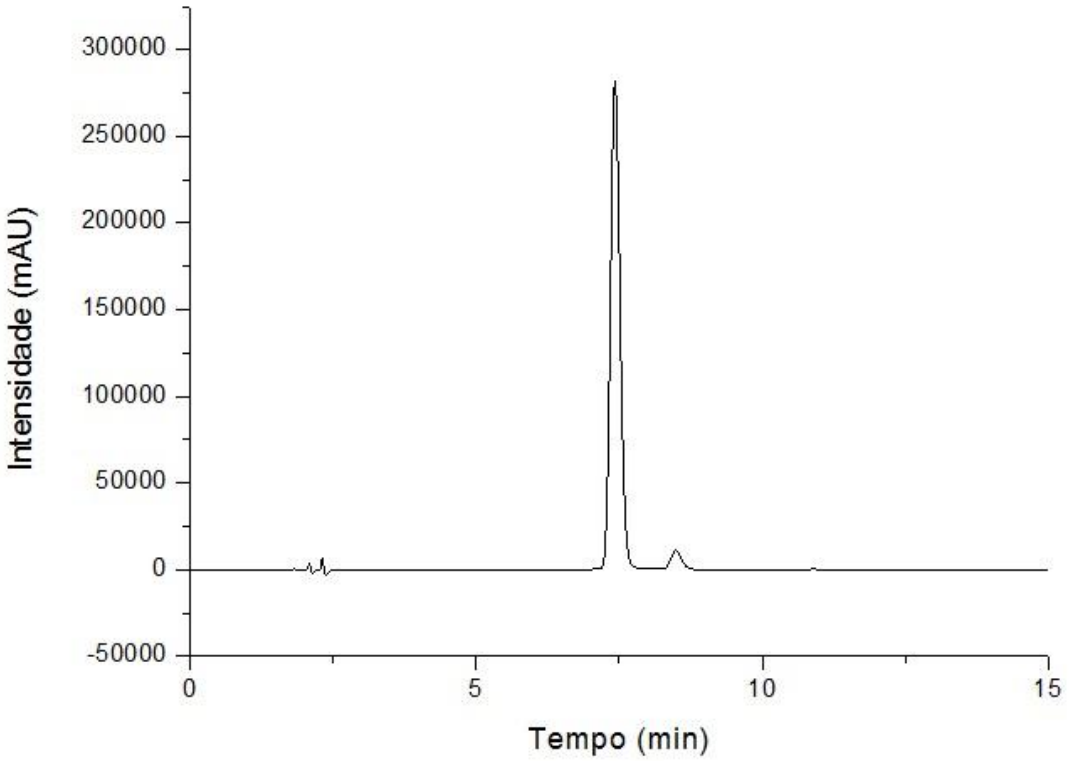
Para este parâmetro, foi aplicado o teste *t* Student, o qual demonstrou que o t calculado para cada concentração foi de $8{,}73.10^{-5}$; 0,0019 e 0,2878; respectivamente, sendo estes menores que o t tabelado (4,3026), comprovando que não houve diferença significativa entre as três concentrações analisadas.

PARTE EXPERIMENTAL V

5.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISOMERO DO LPSF/FZ4

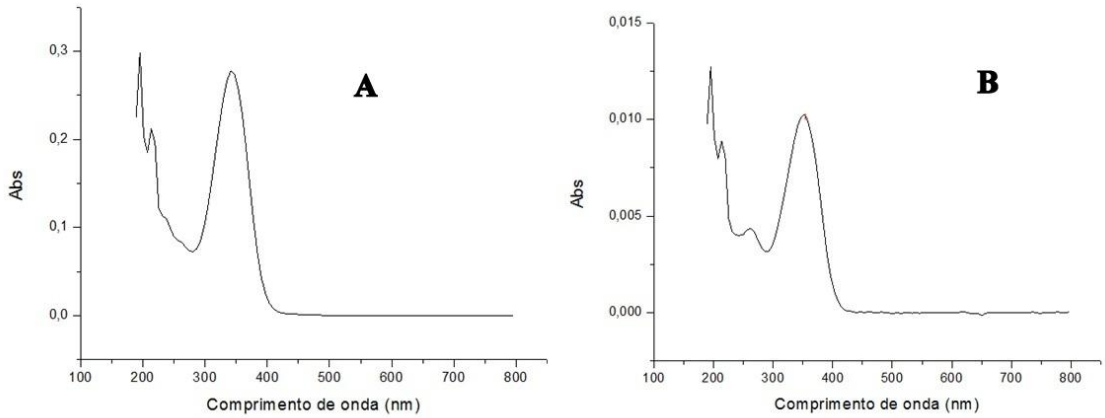
Como base no método já validado por CLAE-DAD, manteve-se a coluna de octadecilsilano (C18) e modificou-se a fase móvel para metanol:água (70:30, v/v) a 1,0 mL/min, onde observou-se a presença de mais de um pico no cromatograma (figura 28).

Figura 28 - Cromatograma da matéria-prima obtido pelo método desenvolvido



No entanto ambos os picos apresentaram o mesmo comprimento de onda quando observada as varreduras espectrométricas correspondentes a cada um deles (Figura 29).

Figra 29 - Varreduras espectrofotométricas: (A) pico maior e (B) pico menor

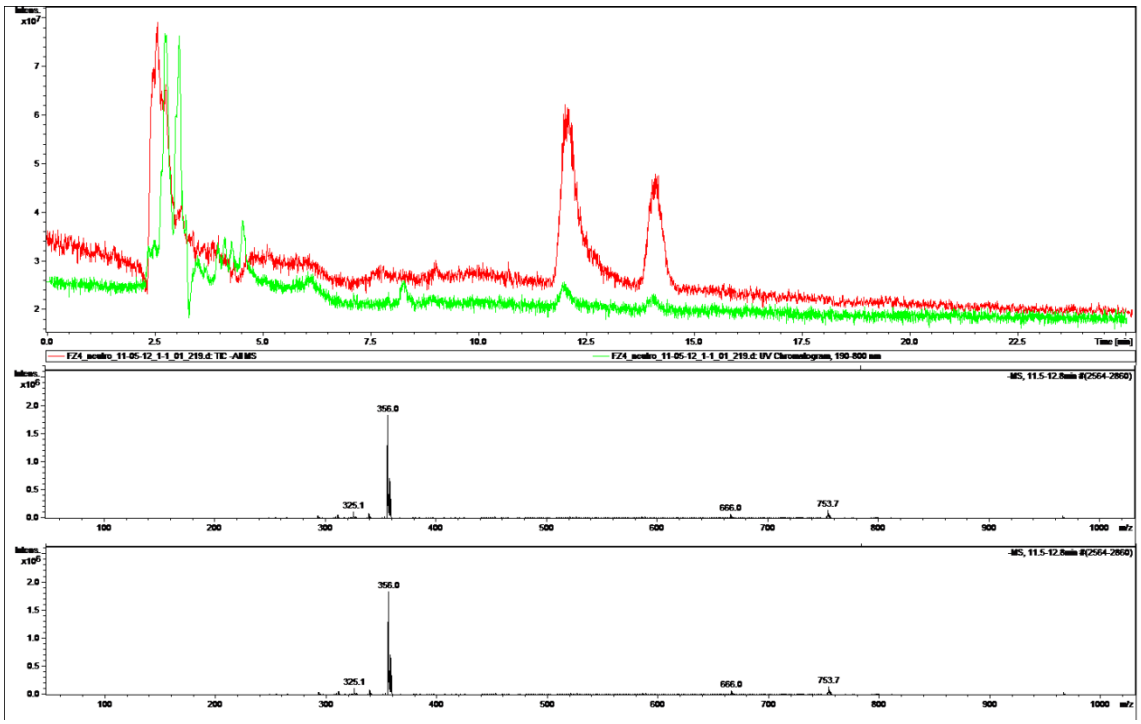


Como base na literatura, compostos imidazolidinicos podem apresentar isômeros Z e E, fato este que nos levou a buscar se o pico menor presente no cromatograma seria

um isômero e não um contaminante, uma vez que não se conseguiu separa-lo por técnicas de purificação como recristalização.

Logo, buscou-se utilizar a metodologia analítica de dosemanento desenvolvida em um CLAE-MS-MS a fim de comprovar a presença de um isômero na amostra (Figura 30).

Figura 30 - Cromatograma obtido com o método desenvolvido em CLAE –MS-MS



Com base na Figura 30, afirmar que ambos os picos presentes no cromatograma pertencem a mesma substância, uma vez que sua massa molecular é a mesma, [M -1] = 356. Logo, na amostra analisada tem-se a presença dos isômeros Z e E do LPSF/FZ4, sendo o pico maior o isômero Z e o pico menor o isômero E, o qual aparece em uma proporção em torno de 4% comparado ao isômero marjoritário.

O Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos possui outras imidazolidinas no seu acervo de moléculas que apresentam também misturas de isômeros e através de análises mais aprofundadas já realizadas nessa classe de moléculas se pode afirmar que o isômero Z é uma configuração mais estável, sendo então o isômero majoritário (BRANDÃO, 2000; SANTOS, 2005).

PARTE EXPERIMENTAL VI

5.6 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES

5.6.1 Diagrama de solubilidade de fases

A realização de um estudo de solubilidade de fases é importante a fim analisar, previamente, o comportamento do LPSF/FZ4 na presença de diferentes carreadores e principalmente verificar qual será o incremento de solubilidade em água que essas substâncias proporcionaram ao composto terapêutico. Sendo assim, este estudo serve como um indicador de quais carreadores serão candidatos a compor a dispersão sólida.

Como já descrito, um dos tipos de carreadores utilizados para a obtenção de dispersões sólidas são os polímeros hidrofílicos. Dentre eles, o PVP, o PEG e o HPMC são muito utilizados para este fim, pois ocasionam resultados satisfatórios para o incremento de solubilidade fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água. Além dos polímeros hidrofílicos, os surfactantes/emulsionantes, também já mencionados, surgiram com a intenção de proporcionar aos fármacos ou protótipos, com problemas de solubilidade, maior biodisponibilidade quando comparada a proporcionada pelos polímeros hidrofílicos e com a grande vantagem de evitarem a recristalização.

O LPSF/FZ4 é uma NEQ inssolúvel, uma vez que sua solubilidade em água foi 1,12 µg/mL. Além disso, no geral, neste estudo de solubilidade de fases foi observado, através dos resultados obtidos, que os diferentes carreadores utilizados influenciaram de forma distinta o comportamento do LPSF/FZ4 em relação à sua solubilidade em água.

A escolha dos carreadores foi feita através da análise dos seguintes parâmetros: a linearidade das curvas obtidas para cada carreador, o incremento de solubilidade aquosa proporcionado e a espontaneidade no processo de solubilização da substância a ser analisada (no caso do estudo, do protótipo).

A linearidade das curvas obtidas para cada carreador é um parâmetro importante a se verificar porque permite prever o comportamento da solubilidade da substância analisada com o aumento da concentração do carreador. Este parâmetro foi analisado a partir do coeficiente de correlação (R^2) de cada curva e da concentração do protótipo dissolvido nas concentrações de carreadores testadas. Na tabela 9, pode-se observar que os valores de R^2 ficaram entre a faixa de - 0,8860 e 0,9993 o que significa que nem todos os carreadores apresentam um incremento linear da solubilidade, tornando impossível prever, em alguns casos, o comportamento da solubilidade do LPSF/FZ4 em

solução com o aumento da concentração do carreador. Os carreadores que apresentam um comportamento mais previsível e linear ao LPSF/FZ4 foram o polissorbato 80, o LSS e o Myrj 52. Isso significa que tais carreadores proporcionaram um incremento de solubilidade proporcional a sua concentração.

Tabela 15: Análise do estudo de solubilidade do LPSF/FZ4 obtidos com os carreadores a 25 ºC para as concentrações de melhor desempenho.

Carreador	**Coeficiente angular**	**R^2**	**% de incremento (conc. carreador %)**
Polímeros			
PVP K-30	$3{,}10 \times 10^{-2}$	0,6065	403,35 (1%)
PEG 4000	$2{,}35 \times 10^{-3}$	-0,8860	256,08 (0,5%)
PEG 6000	$-4{,}27 \times 10^{-2}$	0,4521	336,33 (0,1%)
HPMC	$-2{,}88 \times 10^{-1}$	-0,4664	1428,04 (0,5%)
Surfactantes			
Polissorbato 80	$1{,}65 \times 10^{0}$	0,9711	5956,79 (1%)
LSS	$5{,}60 \times 10^{-1}$	0,9558	2105,29 (1%)
Myrj 52	$5{,}53 \times 10^{-1}$	0,9993	1941,26 (1%)

O incremento de solubilidade proporcionado foi verificado pelo coeficiente angular, pela solubilidade do protótipo em água quando associado aos carreadores e pela porcentagem de incremento de solubilidade proporcionado pelos carreadores em relação ao protótipo sozinho em água. Como pode ser visto na Tabela 10 os coeficientes angulares das curvas dos carreadores apresentam-se na seguinte ordem crescente de valores: HPMC < PEG 6000 < PEG 4000 < PVP K-30 < Myrj 52 < LSS < Polissorbato 80. Essa relação é semelhante a ordem crescente da porcentagem de incremento de solubilidade (PEG 4000 < PEG 6000 < PVP K-30 < HPMC < Myrj 52 < LSS < Polissorbato 80). De acordo com esses dados, pode-se verificar que, dentre os polímeros hidrofílicos, o HPMC proporcionou maior incremento de solubilidade aquosa ao LPSF/FZ4 e dentre os agentes surfactantes/emulsionantes o melhor resultado foi obtido com o polissorbato 80. Tal constatação pode ser confirmada pelas Figuras 31 e 32.

Figura 31 - Curvas do diagrama de solubilidade com polímeros hidrofílicos

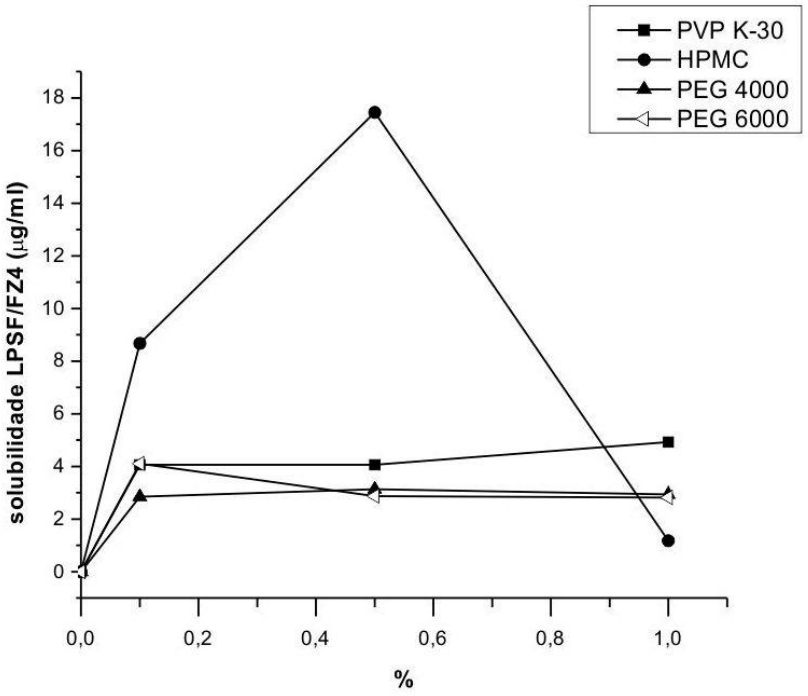
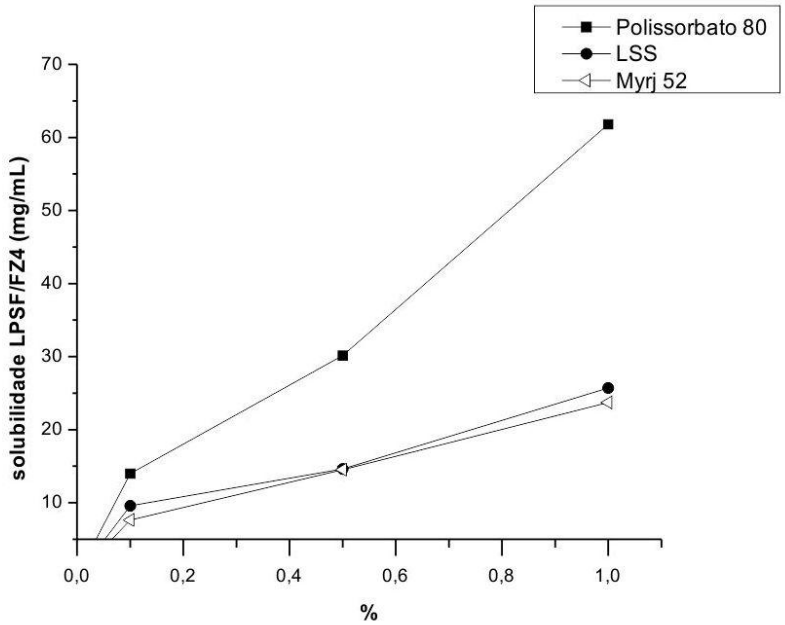


Figura 32 - Curvas do diagrama de solubilidade do LPSF/FZ4 com os agentes surfactantes/emulsionantes



A espontaneidade do processo de solubilização do LPSF/FZ4 foi verificada pelo cálculo da energia livre de Gibbs (ΔG˚). Segundo Patel et al. (2008), este dado está diretamente relacionado ao incremento de solubilidade ocasionado pelo carreador, pois

quanto mais negativo for ΔG° ($\Delta G^{\circ} < 0$), melhor será o efeito solubilizante do carreador. Conforme os resultados anteriores, os valores mais negativos são para o HPMC, dentre os polímeros hidrofílicos, e o para o polissorbato 80, dentre os agentes surfactantes/emulsionantes.

Além disso, os valores de ΔG° são geralmente proporcionais a concentração do agente solubilizante (PATEL et al., 2008). Como exposto na Tabela 16, os valores de ΔG° foram proporcionais a concentrações de todos os carreadores, exceto para o HPMC que teve valor de ΔG° mais negativo na concentração de 0,5 % e para o PEG 6000 cujo valor de ΔG° mais negativo apresentou-se para a concentração de 0,1 %. Tais exceções corroboram com os valores de R^2 encontrados para esses dois carreadores, os quais mostram que o LPFS/FZ4 não apresentou melhora na solubilidade proporcional ao aumento da concentração dos polímeros HPMC e PEG 6000. Para o HPMC na concentração de 1 %, o valor de ΔG° foi positivo, evidenciando a não espontaneidade do processo de solubilização entre este carreador e o protótipo. Isto ocorreu provavelmente devido a viscosidade do HPMC em água, já que o polímero quando solubilizado forma uma malha polimérica de densidade dependente da concentração de HPMC que dificulta a difusão de moléculas no meio, por este motivo o HPMC não foi selecionado para compor a dispersão sólida, visto que o incremento da solubilidade do LPSF/FZ4 deve ser imediato (0 a 2h).

Tabela 16: Valores de energia livre de Gibbs (ΔG°=J.mol^{-1}) para o processo de solubilização do LPSF/FZ4 em meio aquoso com diferentes carreadores a 25 ºC.

Carreador %	**PVP K-30**	**HPMC**	**PEG 4000**	**PEG 6000**	**Polissorbato 80**	**LSS**	**Mryj 52**
0,1	-2978,12	-4866,38	-2101,37	-3010,86	-6049,89	-5112,65	-4547,82
0,5	-2978,12	-6600,20	-2120,09	-2120,09	-7958,01	-6162,12	-6145,60
1	-3461,94	100,51	-2175,37	-2073,05	-9738,92	-7563,72	-7362,37

O estudo de Guedes et al. (2011) verificou que o sistema binário LPSF/FZ4:PVP (9:1) melhorou significativamente a taxa de dissolução do protótipo, no entanto apesar deste aumento na solubilidade da nova entidade química ele ainda não apresenta condições de solubilidade desejada para que possa ser disponibilizado na forma de medicamento.

Conclusão

6 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 principios do *Quality by design* detém informações importantes e permite o desenvolvimento de medicamentos de forma racional.
- 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 os estudos quando da identificação até o desenvolvimento de uma formulação. A calorimetria exploratória diferencial permitiu identificar o LPSF/FZ4 através de sua faixa de 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 pré-formulação, porque permitiu a demonstração de interações ou incompatibilidade droga-excipiente. Nestes estudos, foi observada 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 sozinho e associado com a lactose, mostrando uma diminuição na estabilidade da droga.
- Os métodos apresentado foram desenvolvidos e validados segundo o ICH (ICH Q2A, 2005; ICH Q2B, 2005) e a ANVISA (RE n° 899, 2003) e apresentaram a

confiabilidade requerida para um método analítico, apresentando-se robusto, linear, específico e seletivo, preciso e exato garantindo a qualidade da análise e assim as boas práticas de laboratório e fabricação.

- No estudo de solubilidade de fases, o polímero hidrofílico e o surfactante emulsionante que obtiveram o melhor desempenho foram o PVP-K30 e o polissorbato 80, respectivamente. Sendo assim, estes carreadores foram escolhidos para compor as dispersões sólidas.

Perspectivas

7 Perspectivas

- Obtenção de misturas físicas e dispersões sólidas binárias e ternárias, partindo do(s) melhor (es) polímeros e surfactante emulsionantes definidos no diagrama de fases;
- Caracterização físico-química das dispersões sólidas obtidas, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura, analise térmica, IV, estudo de dissolução, entre outras;
- Avaliação da atividade esquistossomicida das dispersões sólidas obtidas frente a NEQ, através de estudos *in vivo*.
- Validar o método dessenvolvido por CLAE para identificação de isômero.

Referências

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.; MALAQUEÑO, 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.

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 Qualificacão de Fornecedores. **Acta Farm. Bonaerense. v.** 25 p. 170-6, 2006.

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. **Bras. Ciênc. Farm.**, v. 44, n. 4, p. 749-754, 2008.

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** v. 46, p. 343-351, 2010.

American Society for Testing And Materials; **ASTM E 698-79: Arrhenius kinetic constants for thermally unstable material**, Philadelphia, 1984.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas.** 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ARAÚJO, A. A. S.; STORPIRTIS, 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**. v.260, 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**. v. 42, p. 269-277, 2006.

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(suppl. 1), p. 79-83, 2004.
BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A. L. C.; ABATH, A. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Cad. Saú. Púb.**, v. 17, n. 3, p. 725-728, 2001.

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.

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**. v. 20, 1997.

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

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.** v. 25, 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, 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**. v.1, 2010.

BRANDÃO, S.S.F. Síntese, estrutura e avaliação biológica de tiazolidinonas e imidazolidinonas substituídas. Tese. Univerdidade Federal de Pernambuco. 2000

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

BRASIL, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U. 02/06/2003.

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.

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, p. 441-445, 2006.

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

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.**, v. 41, n. 4, p. 390-393, 2008.

CUNHA, S. Métodos simples de formação de monocristal de substancia orgânica para estudo estrutural por difração de raios X. ***Quim. Nova***. v. 31. 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**. v. 28, p. 85, 2007.

DATASUS, 2010. Dispinivel em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pce.def. Acessado em 29/03/10

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

DESCHAMPS, J. R.. X-ray crystallography of chemical compound**s. Life Sciences**. v. 86. p. 585-589, 2010.

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.**, v. 25, n. 4, p. 178-181, 1983.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; Quim. Nova 2006, 29, 300.

Farmacópeia Brasileira, V ed., Agencia Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, **2010.**

FDA. 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>. Acessado em: novembro de 2011.

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

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

GUEDES, F.L.; OLIVEIRA, B.G.; HERNANDES, M.Z.; DE SIMONE, C.A.; VEIGA, F.J.B.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R. Solid Dispersions of Imidazolidinedione by PEG and PVP Polymers with Potencial Antischistosomal Activities. **AAPS PharmSciTech**. v.12, p. 401 – 410, 2011.

GUIMARÃES, C.A.; MENAA, F.; MENAA, B, QUENCA-GUILLEN, JS.; 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.** v. 505, p. 73-78, 2010.

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

ICTAC. Disponível em: http://www.ictac.org/. Acesso em 23 de outubro de 2012.

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 18/03/10.

International Conference on Harmonization, "**ICH Q6A**: Test Procedures and Acceptance Criteria For New Drug Substances And New Drug Products: Chemical Substances", Step 4, 1999.

International Conference on Harmonization, "**ICH Q8**" : Pharmaceutical development. Step 4, 2009.

International Conference on Harmonization, " **ICH Q8**: PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT", step 4, 2009.

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.**, 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. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansoni. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 6, p. 707-711, 1999.
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.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n.3, p. 303-308, 2000.

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**, v. 57, p. 127–142, 2010.

KOROKOLVAS A. Dicionário terapêutico Guanabara. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p159.

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., v. 4206, n. 6, 2007; 206(4).

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.**, 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.**, v. 108, n. 2-3, p. 209-217, 2008.

LEMOS, A. Brionisio. Generalidades da analise térmica. **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens -ITAL**. v.15, 2003.

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. Tropical, v. 34, n. 1, p. 150-151, 2001.

LIMA, M.C.A.; COSTA, L.B.; GÓES, A.J.S.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; LUU-DUC, C. Synthèse et activité antimicrobienne dês chlorobenzyl benzylidène

imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. **Pharmazie**.v.47, p. 182 – 184, 1992.

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**, v. 31, p. 117-124, 2010.

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

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**. v. 27, p. 151-155, 2006.

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**. v. 27, p. 151-155, 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**, v. 10, n. 4, p. 1444-1451, 2009.

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

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

MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. **Clin Micro Rev.**, 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**, v. 3, n. 1, p. 357-361, 2009.

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**. v.105, p. 361, 2011.

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

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.*** v. 44, 2008.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. et al. Parasitol Hum 2005; 11:193-222.

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**, 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**, v. 22, n. 1, p. 5-10, 1999.

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

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

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Analise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**,v. XY, p. 1-7, 2011.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; VIANNA-SOARES, C. D .; PIANETTI, G. A. Analise térmica aplicada a caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. **Quim. Nova**, v. 33, p. 1653-1657, 2010.

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.; ALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALINDO, S. L. A Resposta do Schistosoma mansoni Mantido In Vitro frente a Derivados Imidazolidinônicos. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 23, p. 343-8, 2004.

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

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

PARAENSE, W. L. Fauna Planorbídica do Brasil. In: Lacaz, CS. 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, v. 23, p. 1-7, 1963.
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.**, v. 37, n. 1, p. 61-72, 2001.

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

PEREIRA, S. R. S.; SERUFO JC, ANDRADE, L. M.; ANTUNES, C. M.;, LAMBERTUCCI, J. R. Mielorradiculopatia esquistossomótica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 3, p. 261-272, 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, p. 323–329, 2010.

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. Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

RATHORE, A. S.; WINKLE, H. Quality by design for biopharmaceuticals. **Nature biotechnology**, v. 27, P. 26 – 34, 2009.

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 Públ, v. 15, n. 4, p. 364-370, 19810.

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, p. 155-178, 2001.

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.**, v. 35, n. 5, p. 484-488, 2009.

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. v.** 24, p. 83-7, 2005.

ROUQUAYROL MZ, FILHO NA. **Epidemiologia e Saúde.** 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003.708p.

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.**, v. 42, n. 5, p. 277-282, 2009.

SALVIO-NETO, H., NOVA'K, Cs., MATOS, J. R.Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. J **Therm Anal Calorim**. v.97, 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, p. 3093-399, 2011.

SANTOS, L.C. Synthèse et évaluation de l'activité biologique de nouveaux derives imidazoliniques 2,3,5-trissubstitués. Universidade Federal de Pernambuco e Université de La Mediterranée, 2005

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.**, v. 14, n. 4, p. 407-412, 2008.

SCHNITZLER, E.; LENÇONE, K.; KOBELNIK, M.Caracterização de fármacos por analise térmica. **UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia.** V.8, p. 91-100, 2002.

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.

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**, v. 30, p. 1550-1554, 2011.

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.**, v. 40, n. 3, p. 321-325, 2007.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES DE LA ROCA, M. F.; 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**, v. 11, p. 1391-1396, 2010.

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

STORPITIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2009. p. 32-65.
TETKO, I. V. Computing chemistry on the web, Drug Discov. Today, 2005, 10, 1497-500, download pre-print.

TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory - design and description, J. Comput. Aid. Mol. Des., 2005, 19, 453-63, article.

The Synaptic Leap. Enantioselective Synthesis of Praziquantel 2006. Disponível em: <http://www.thesynapticleap.org/schist/projects>. Acesso em: 19 maio 2010.

TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TITA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 56, p. 221-227, 2011.

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

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

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

VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, http://www.vcclab.org, 2005.

VENNERSTROM JL, DONG YX, CHOLLET J, MATILE H, PADMANILAYMAN M, TANG YQ, CHARMAN WN. Spiro and Dispiro 1,2,4-Trioxolane Antimalarials. **U S Pat** 2002; 26.

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 ecomposition of Efavirenz and Compatibility Studies with Selected Excipients. **Lat. Am. J. Pharm**.v. 27, p. 211-6, 2008.

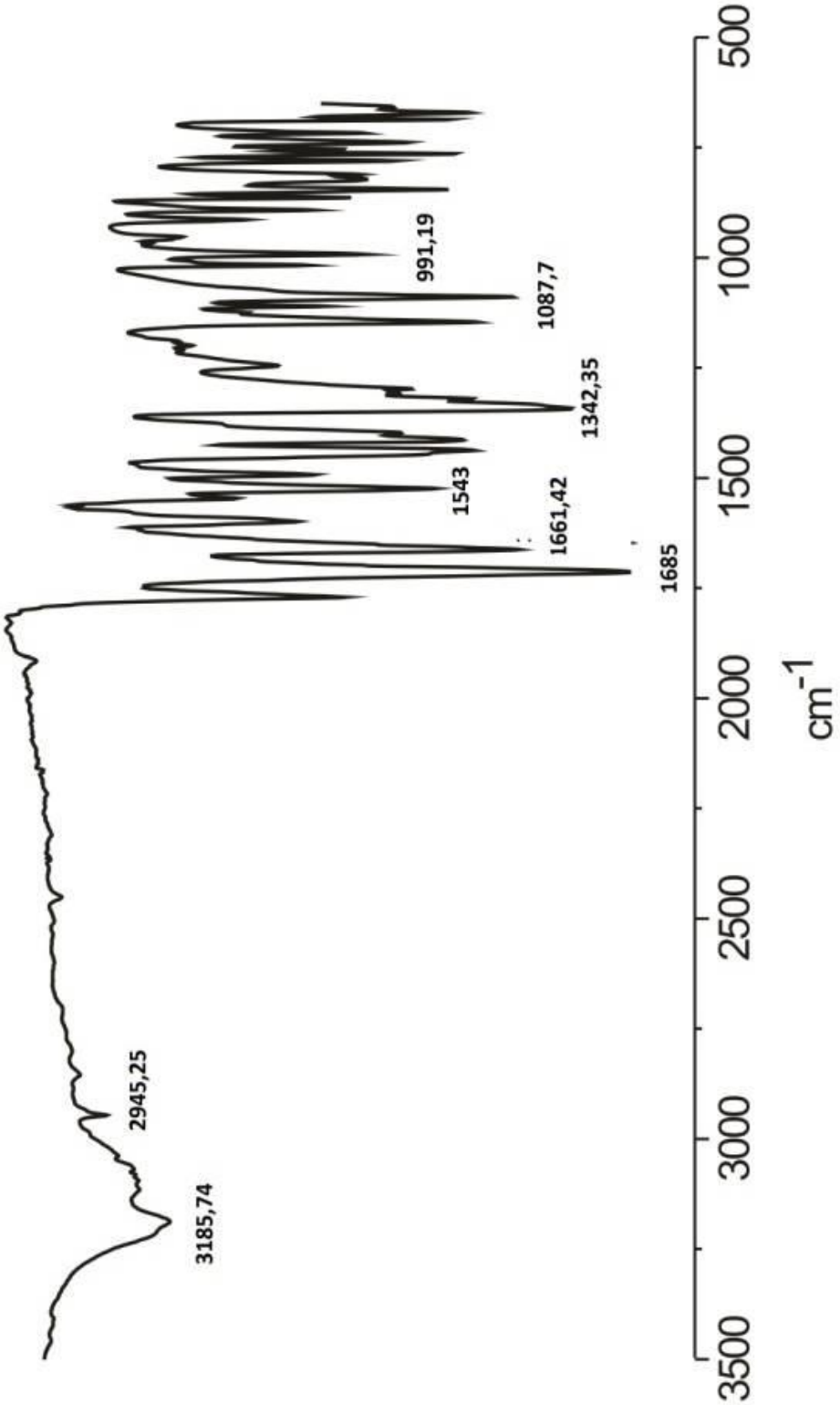
VYAZOVKIN, S. Thermal Analysis. **Anal. Chem.** v. 78, p. 3875, 2006.
WHO, *2011* (*World Health Organization)*. **Programmes and projects, *Schistosomiasis.*** Disponível em: < http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em: 26 de dezembro de 2011.

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

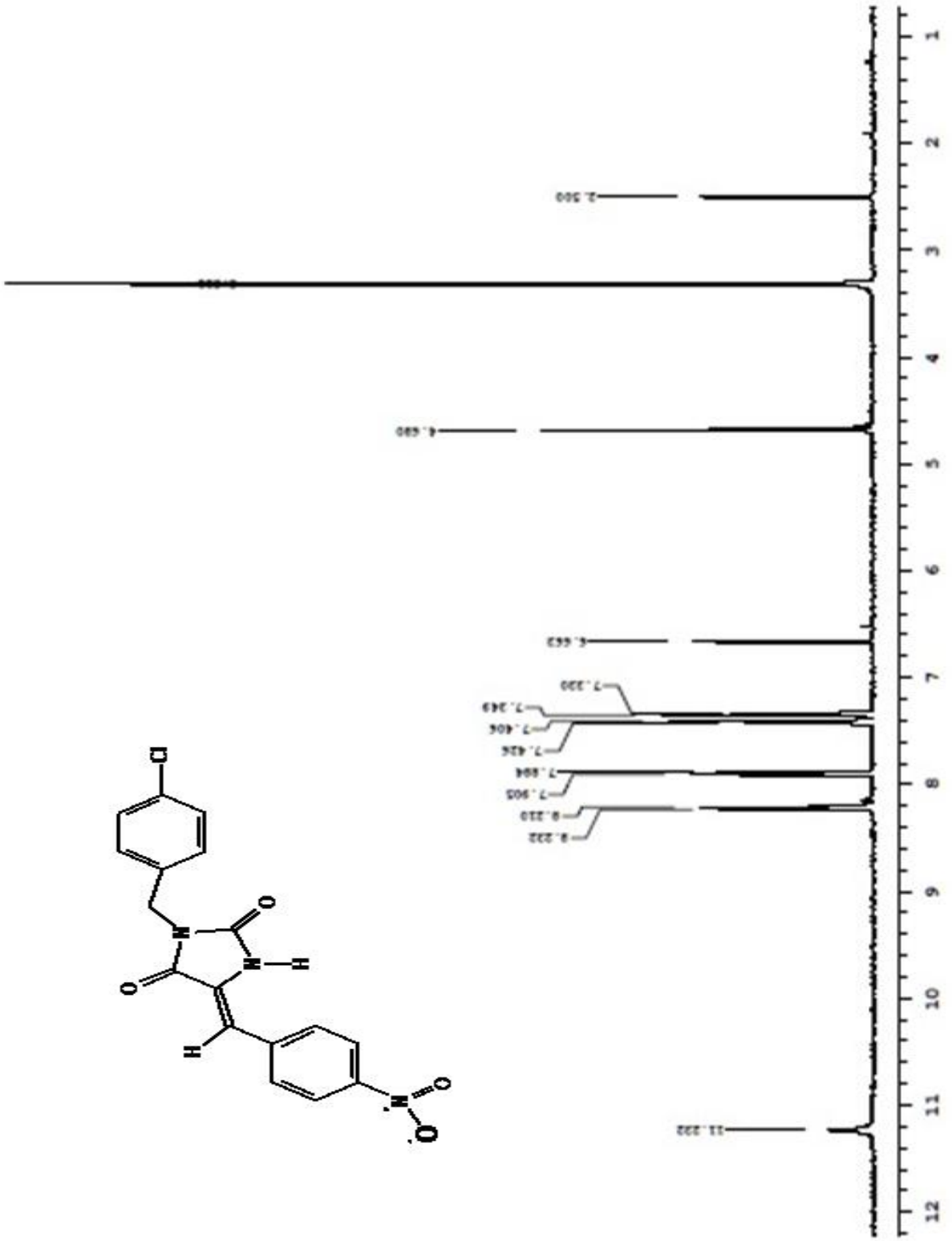
YANG, Z.; WU, W.; LI, Y.; WU, Y. Design and Synthesis of Novel Artemisinin-Like Ozonides with Antischistosomal Activity. Helv. Chim. Acta, v. 88, n. 11, p. 2865-2872, 2005.

Apêndice

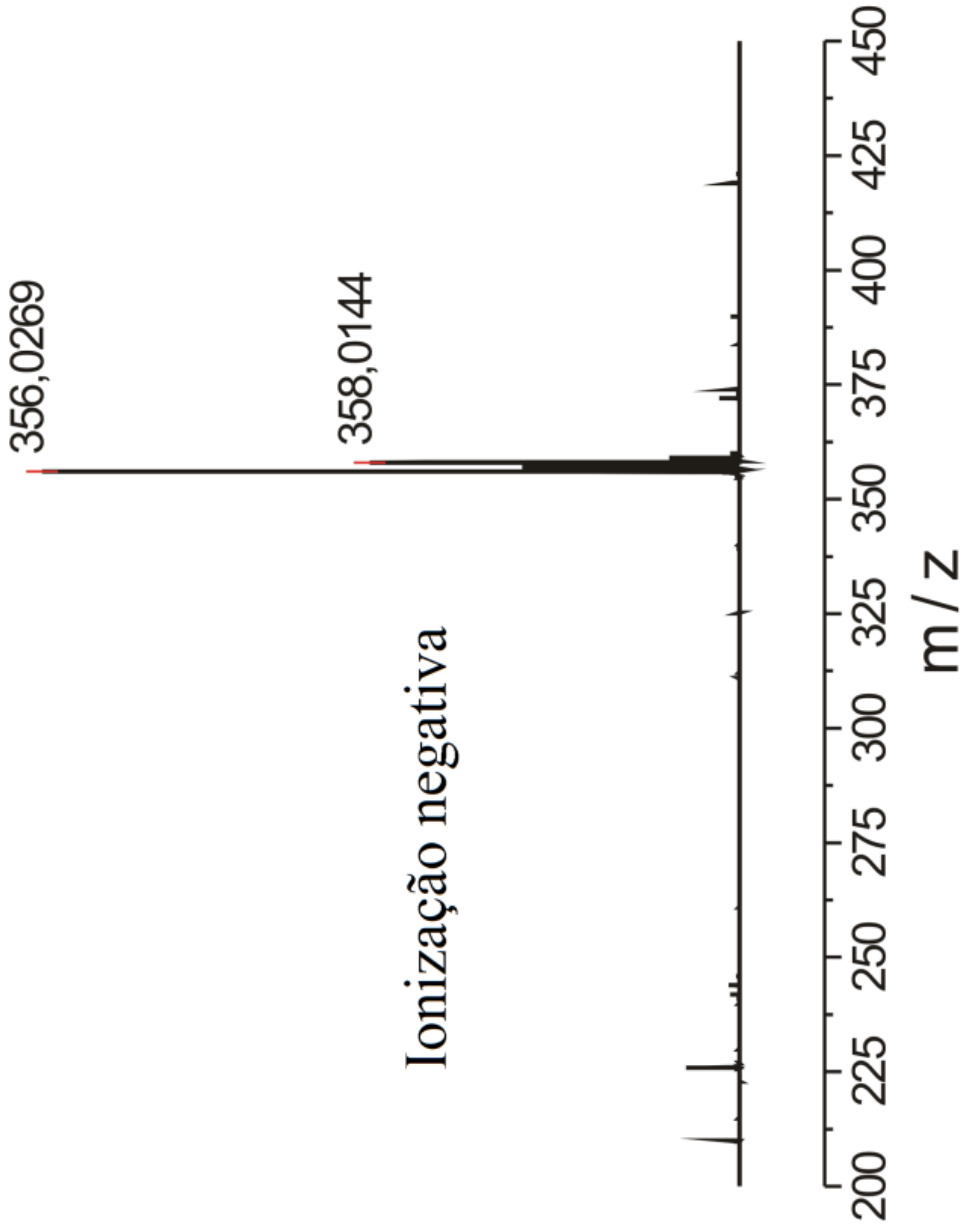
APÊNDICE A – Espectro na região do Infravermelho do LPSF/FZ4.



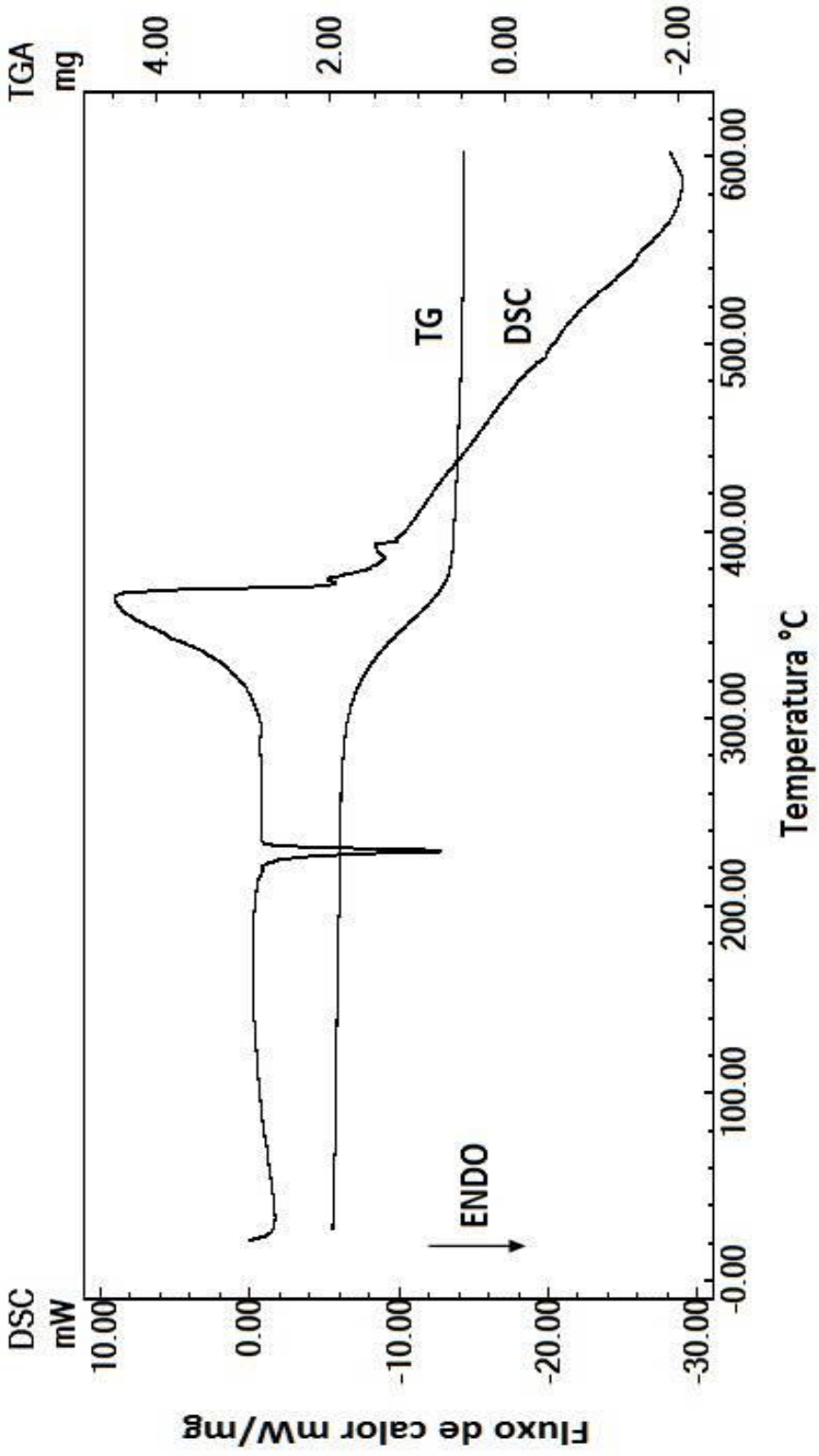
APÊNDICE B – RMN’H do LPSF/FZ4



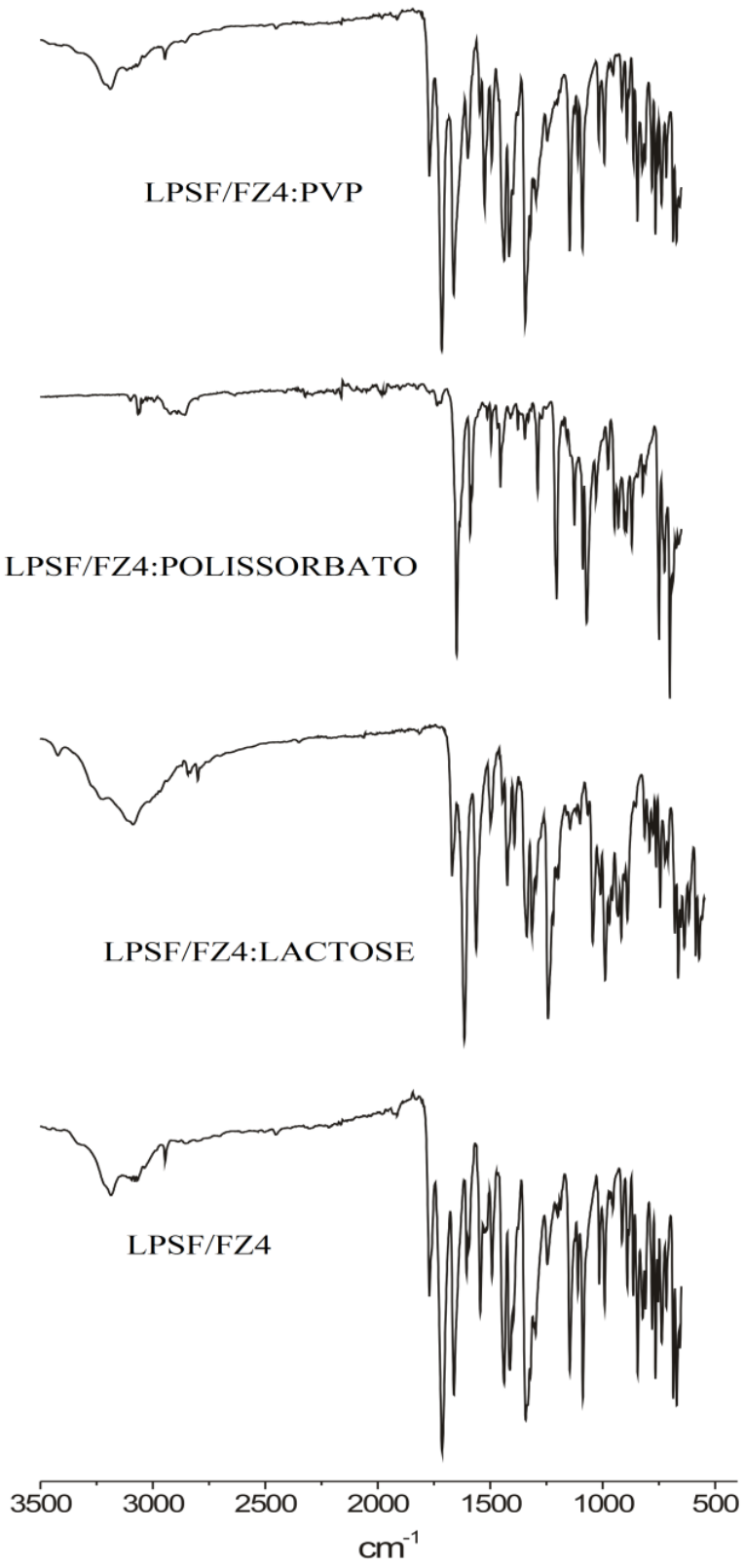
APÊNDICE B – Espectro de massa LPSF/FZ4



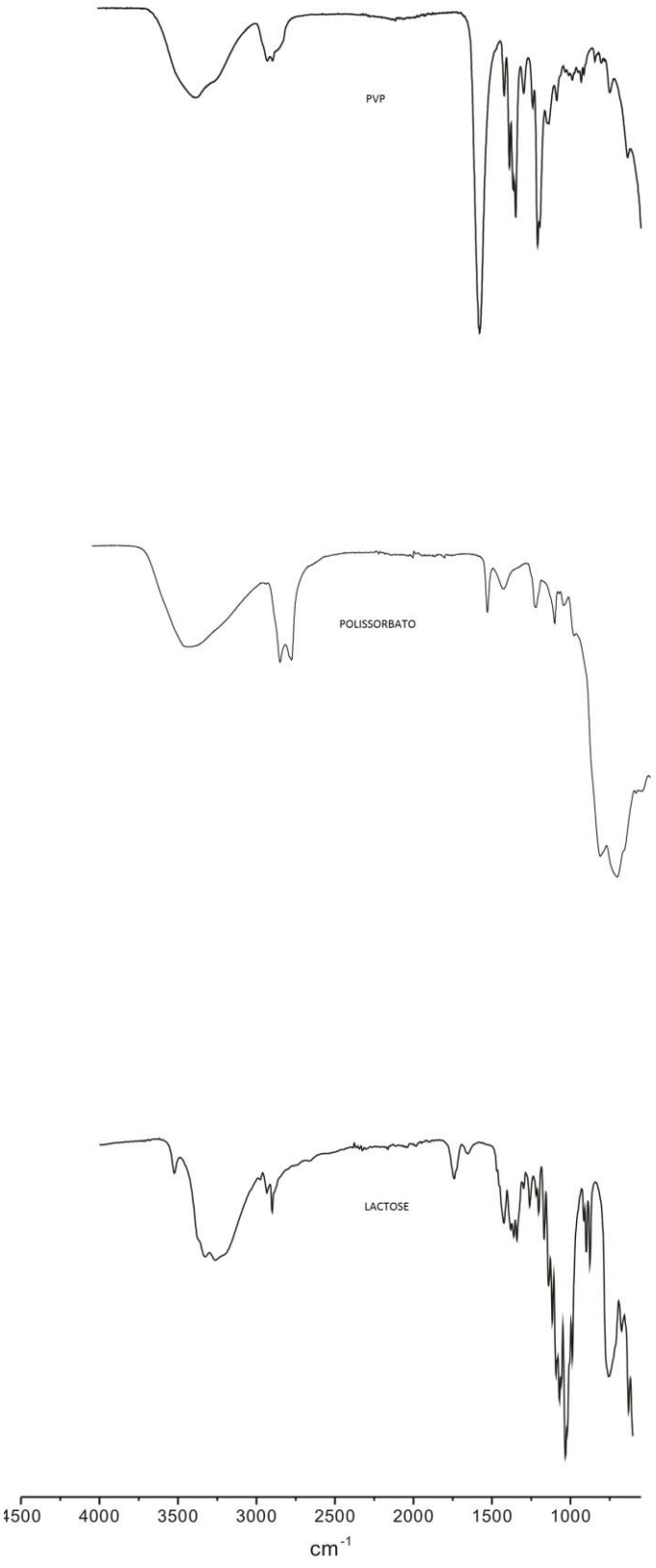
APÊNDICE C – Curvas TG e DSC do LPSF/FZ4 obtidas a 10ºC/min, com massa de 3 mg, sob atmosfera de N_2 em fluxo de 50 mL/min.



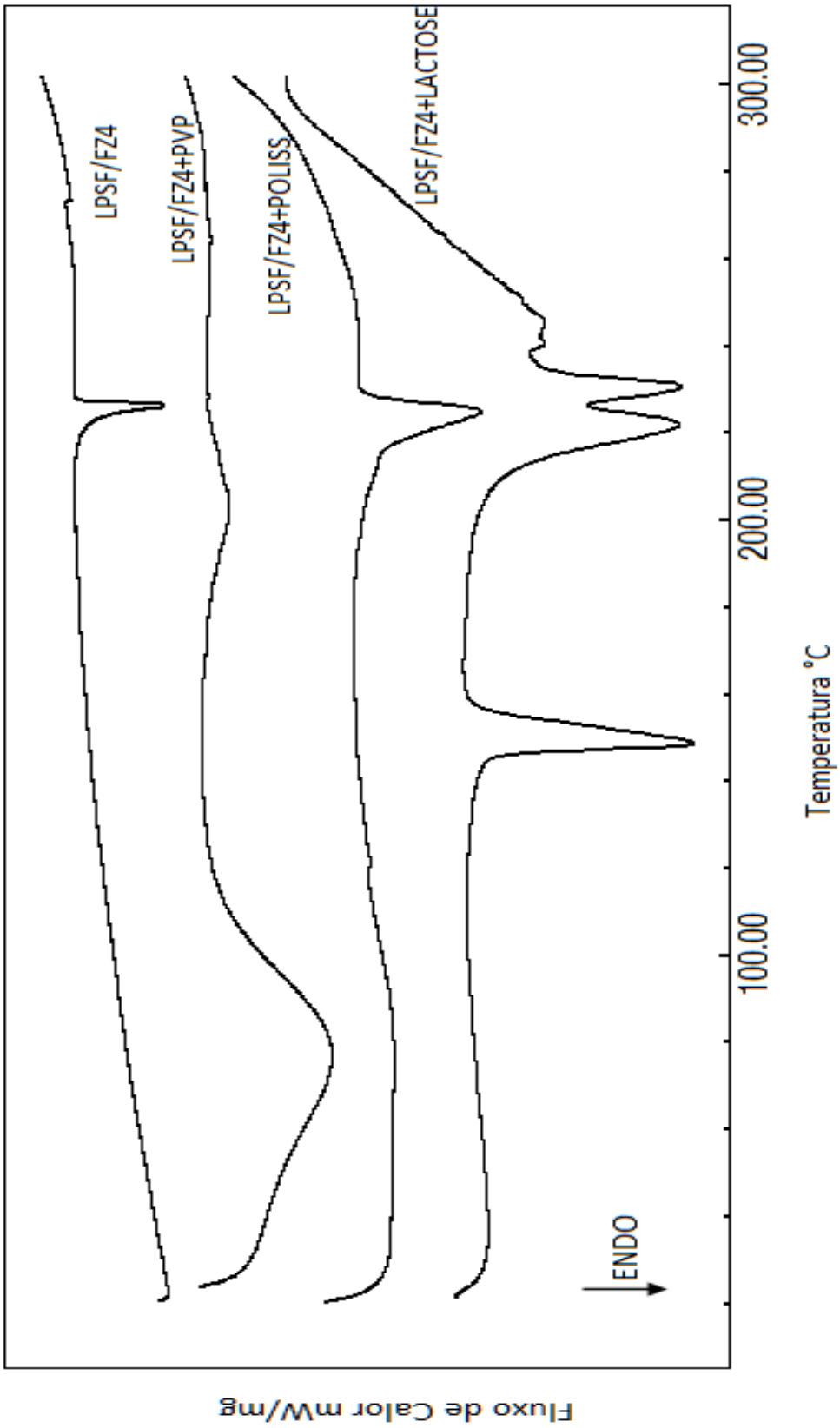
APÊNDICE D – Espectro na região do IV das misturas físicas 1:1 LPSF/FZ4 com Lactose, PVP K-30 e Polissorbato 80



APÊNDICE E– Espectro na região do IV da Lactose, PVP K-30 e Polissorbato 80



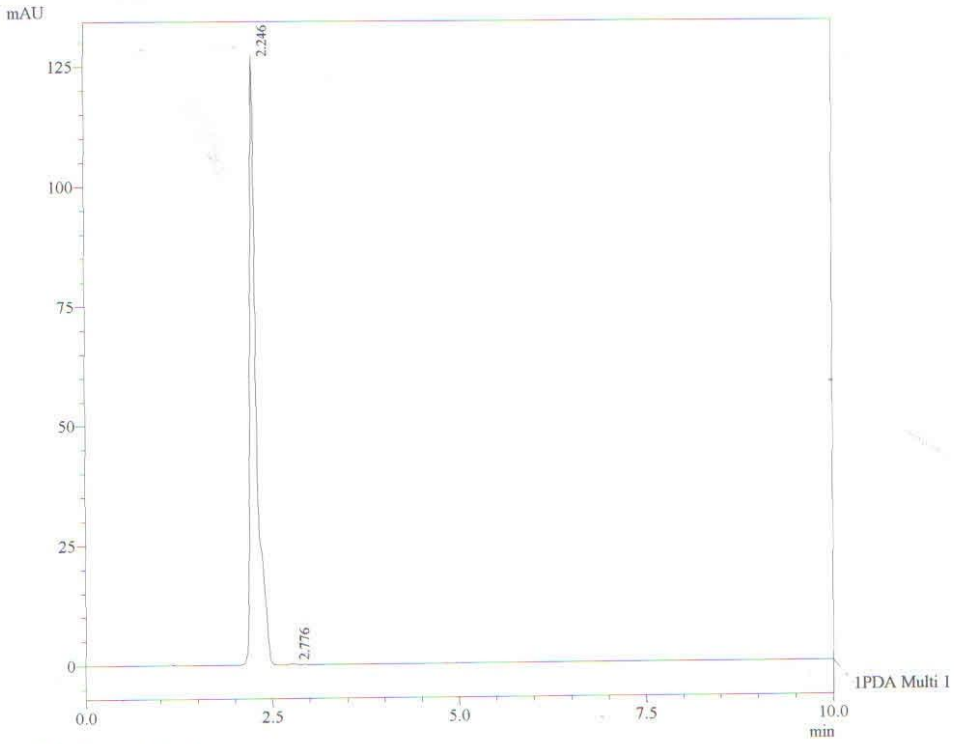
APÊNDICE F – Curvas de DSC do LPSF/FZ4 e excipientes obtidos em atmosfera dinâmica de $N_{@}$ (50mL/min) e razao de aquecimento de 10ºC/min



APÊNDICE G – Cromatograma do LPSF/FZ4 obtido com o método desenvolvido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DOS MEDICAMENTOS

07-08-12 FZ4 validação



1 PDA Multi 1 / 349nm 4nm

Parâmetros

PDA Ch1 349nm 4nm

Pico	T Retenção	Área	Resolução	N° de Pratos Teóricos	Fator de Cauda	Separação	k'
1	2.246	763596	0.000	3179.398	1.894	0.000	0.000
2	2.776	1049	3.305	4738.571	1.052	0.000	0.236
Total		764645					

APÊNDICE H – Artigo de revisão publicado na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2012;33(1):9-16
ISSN 1808-4532

Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica

Keyla Emanuelle Ramos Silva[1,2]; Rosali Maria Ferreira Silva[1,3]; Salvana Priscylla Manso Costa[1]; Larissa Araujo Rolim[1]; Maria do Carmo Alves Lima[1]; Pedro José Rolim-Neto[1]*

[1]Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.
[2]Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia , Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Brasil.
[3]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém, Brasil.

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 patologia. 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.

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 (Parise-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 & Almeida-Filho 2003; Almeida et al., 2008).

Atualmente, a Oxaminiquine 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 (Fenwa 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.

Autor correspondente: Pedro José Rolim-Neto - Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) - Departamento de Ciências Farmacêuticas Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Arthur de Sá, s/n CEP. 50.740-521 - Cidade Universitária - Recife - PE - Brasil - tel/fax: (81) 32721383 - e-mail: pedro.rolim@pq.cnpq.br

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 (Jarégui-berry 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 Rene Rachou (MG), Núcleo de Pesquisas da Bahia e Centro de Pesquisas Aggeu 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	86.809	1.361	1.340
Região Nordeste	6.287.464	315.826	289.126
Região Sudeste	3.801.588	148.428	136.310
Região Sul	125.760	1.393	1.278
Região Centro-Oeste	1.946	11	11
TOTAL	10.325.508	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 dimercaptossuccinato 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 hicantona 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-(3-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: oxamniquina e praziquantel.

O praziquantel, conhecido estruturalmente como (±)- 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. mathei*, *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 Na^+-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 espástica. 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, 1995).

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 seria a tolerância a essa dose mais alta. Com a dose de 50 mg/kg curaram-se 59,0% 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 do que sob a forma de comprimidos laqueados.

A oxamniquina apresenta menor custo em relação ao praziquantel (Korolkovas, 1999). É ativa nas formas intestinal e hepatesplênica de infecções causadas exclusivamente pelo *S. mansoni*, espécie única no Brasil (Tuzun & Bronshtein, 1986). Foi lançada no Brasil pelos laboratórios Pfizer®, sob o nome de Mansil®, para as formas farmacêuticas cápsulas e suspensão (DEF, 1999; Korolkovas, 1999). É obtida em 1972 por Kaye e Woolhouse por meio de hidroxilação microbiana da tetraidroquinolina. Estruturalmente, corresponde ao (±)-1,2,3,4 – tetraidro-2-[(isopropilamino)metil]-7-nitro-6-quinolinometanol (Parise-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 mansoni (Lescano et al., 2004).

Tártaro emético, por exemplo, uma droga de longa data descartada, foi recentemente reconsiderada para o tratamento da esquistossomose como lipossoma conjugado. Aparentemente, a nova forma de apresentar a droga não só reduz a atividade toxicidade, mas alargado as fases tardias da infecção parasitária em camundongos (Ribeiro- dos-Santos et al., 2006).

Devido ao praziquantel (PZQ) e a 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. Freza 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 ograma 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 a 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 é 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 de ambas as β-CD e HP-β-CD. Portanto, a melhoria na solubilidade aquosa foi observada em relação ao fármaco que provavelmente deverá ter a biodisponibilidade oral 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), etc., têm sido relatados previamente para aumentar a complexação de várias moléculas da droga 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 a droga e 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%, em 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 polilactico; o poliglicólico e seus copolímeros, como o ácido poli lactico-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 uma droga 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 assenta 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).

Vários métodos de produzir o componente esquistossomicida puro existem, porém são consideravelmente mais caros do que onde 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 tomada, 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 (Parise-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 Peptídeo.

Seis biomoléculas foram selecionadas pela Organização Mundial da Saúde como possíveis promissoras candidatas à vacina contra a esquistossomose humana: a) glutationa 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 (Parise-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 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 um possível potencial como candidatos vacinais (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 dessa única droga eficaz para controle da esquistossomose. Portanto, além do desenvolvimento de novas drogas, 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 imidazolodiônicos 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 sólidas, 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 patologias, dentre elas o câncer. Atualmente, a artrite reumatoide é tratada com medicamentos à base de ouro, como auranofina, aurotiomalato 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 ordem 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 antiparasitário, são os oxadiazóis.

Sayed et al., (2008) identificaram oxadiazol 2-óxidos como novos compostos para quimioterapia da esquistossomose. Tais compostos 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 matança do parasita.

Poucos grupos de produtos de origem vegetal têm notáveis propriedades antiparasitárias, tais como alcaloides de quinolina contra Leishmania amazonensis, alcaloides indólicos contra Plasmodium e Entamoeba e sesquiterpenos contra Plasmodium. Investigação semelhantes com Schistosoma usando essas novas formulações de drogas

deve ser considerada com urgência (Ribeiro-dos-Santos et al., 2006).

Felizmente, a artemisinina, ingrediente ativo da planta *Artemisiaannua*, é uma lactona sesquiterpênica e seus derivados semissintéticos, tais como di-(3) artemeter, artester e artesunato, têm sido produzidos e foram reconhecidos amplamente com efeito antimalárico, assim como apresentou atividade esquistossomicida muito boa (Doenhoff et al., 2008; Yang et al., 2005).

Esses compostos são bem tolerados e apresentam apenas ligeiros efeitos secundários, mas o seu mecanismo de ação sobre a esquistossomose ainda não é totalmente compreendido. Artemisininas são de especial interesse porque são mais ativos contra vermes imaturos do que o PZQ e a oxamniquina. Depois de ensaios clínicos em massa, o Ministério da Saúde Pública China 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 não por uma fracção 1,2,4-trioxolana, como a espiro 1,2,4 - trioxolanas e dispiro 1,2,4-trioxolanas, 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. 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 possue baixa solubilidade em água e subsequentes problemas para alcançar níveis sanguíneos terapeuticamente relevantes. A solubilidade de um fármaco constitui requisito prévio a 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.

ABSTRACT

Alternative therapeutic agents to combat Manson's schistosomiasis

Manson's schistosomiasis is classified by the Ministry of Health as a neglected disease caused by the intravascular trematode *Schistosoma mansoni*. Endemic areas are directly related to poor hygienic conditions, as well as poverty and a low level of economic development. Currently, praziquantel is the drug of choice used to treat this condition, but it is relatively toxic, due to its low solubility, and there are reports of the parasite developing resistance to the treatment. In this context, there is a need to search for new therapeutic agents that can be used to treat this disease. This review covers the search for a new chemotherapy and suggests the possibility that the best existing drug vectorization systems may be able to combine therapeutic advantages with the drug of choice for the treatment, to the benefit of the infected population.

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

REFERÊNCIAS

Albuquerque MCPA, Pitta MGR, Irmão JI, Peixoto CA, Malaquias E, Santana JV, et al. Tegumental Alterations in Adult Schistosoma mansoni Treated with Imidazolidine Derivatives. Lat Am J Pharm. 2007;26:65-9

Albuquerque MCPA, Silva TG, Pitta MGR, Silva ACA, Malaquias E, Santana JV, Lima MCA, Galdino SL, Barbe J, Pitta IR. Synthesis and schistosomical activity of new substituted thioxo-imidazoline compounds. Die Pharmazie 2005;60(1):13-7.

Almeida AE, Souza ALR, Allegretti SM, Fraiza TF, Pinto MC, Ferreira AG, Chung MC. Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina. Rev Bras Ciênc Farm. 2008; 44(4):749-54.

Barbosa CS, Domingues ALC, Abath A. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. Cad Saúde Pública. 2001;17(3):725-8.

Barbosa CS, et al. Spatial distribution of Schistosomiasis Foci on Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(suppl. I):79-83.

Barbosa CS, Pieri OS, Silva CB, Barbosa FS. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. Rev Saúde Pública. 2000;34:337-41.

Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccines: research to development. Parasitol Today. 1998;4(3):99-104.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília, DF; 2005.

Christopherson JB. The successful use of antimony in bilharziasis. Lancet 1918; 2:325.

Cioli D. Chemotherapy of Schistosomiasis: An Update. Parasitol Today. 1998;14(10):418-22.

Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Machado SS, Ferreira HS. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo Schistosoma mansoni. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(4):390-3.

Couto JLA. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas, Rev Soc Bras Med Trop 2005;38(4):301-4.

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

DEF. Dicionário de especialidades farmacêuticas. Rio de Janeiro: Publicações Científicas; 1998/1999. p. 615-6.

Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. Curr Opin Infect Dis. 2008;21:659–67.

Emanuel A, Prata A. Praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni em crianças. Rev Inst Med Trop. 1983;25(4):178-81.

FIOCRUZ. 2010. Disponível em: <http://www.coc.fiocruz.br/.../fundo_endemias_rurais.htm>. [citado 2010 jan. 18].

Frezza TF, Madi RR, Banin TM, Pinto MC, Souza ALR, Gremião MPD, Allegretti SM. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2007;28 (2):209-14.

Guedes FL. 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]. Recife: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPE; 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 . [citado 2010 março 18].

Jaréguibarry S, Ansart S, Perez L, Danis M, Bicaire F. Neuroesquistossomose Caumes E. aguda: dois casos associados com vasculite cerebral. Am J Trop Med Hyg. 2007;76:964-6.

Jesus MB, Pinto LMA, Paula E. Caracterização do complexo sólido Praziquantel em β-ciclodextrina. IX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP; 2001 set 27 – 28, Campinas.

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(3):303-8.

Katz N, Coelho, PMZ. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. Acta Trop. 2008;108:72-8.

Katz N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansoni. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(6):705-11.

Korolkovas A. Dicionário terapêutico Guanabara. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p139.

Kuntz AN, Davioud-Charvet E, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, Arner ESJ, Williams DL. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. PLoS Med. 2007;206(4):1071-86.

Lambertucci JR, Pereira SRS, Carvalho TA. Simultaneous occurrence of brain tumor and myeloradiculopathy in schistosomiasis mansoni: case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(3):338-41.

Lambertucci JR, Silva LCS, Andrade LM, Queiroz LC, Carvalho VT, Voieta I, Antunes CM. Técnicas de imagem na avaliação da morbidade na esquistossomose mansônica. Acta Trop. 2008;108:209-17.

Lescano SZ, Chieffi PP, Canhassi RR, Boulos M, Neto VA. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. Rev Saúde Pública. 2004; 38(1):71-5.

Lima MCA, Albuquerque MCPA, Oliveira IJ, Malagueño E, Santana JV, Galdino SL, Pitta IR. 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. 2001; 34(1):150-1.

Mainardes RM, Gremiao MPD, Evangelista RC. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. Rev Bras Ciênc Farm. 2006;42(4):523-30.

Maragos S, Archontaki H, Macheras P, Valsami. Effect of Cyclodextrin Complexation on the Aqueous Solubility and Solubility/Dose Ratio of Praziquantel. AAPS PharmSciTech. 2009;10(4):1444-51.

McManus DP, Loukas A. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. Clin Micro Rev. 2008;21(1);225–42

McManus DP. The search for a vaccine against schistosomiasis: a difficult path but an achievable. Immmol Rev. 1999; 71:149-61.

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 Dis. 2009; 3(1):357-361.

Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1551>. [citado 2010 jan. 12].

Parise-Filho RP, Silveira MAB. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. Rev Bras Ciênc Farm. 2001; 37(2):123-35.

Parise-Filho RP, Souza TM, Araújo MB, Fernandes NA, Silveira AMB. Análise químico-farmacêutica da oxamniquina e de suas especialidades farmacêuticas. Rev Bras Ciênc Farm. 2001;37(1):61-72.

Navarro M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. Coord Chem Rev 2009; 253:1619–26

Novaes MRCG, Souza JP, Araújo HC. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. Quim Nova 1999;22(1):3-10.

Oliveira G, Franco G, Almeida SV. The Brazilian contribution to the study of the Schistosoma mansoni transcriptome. Acta Trop. 2008;108:179–82.

Oliveira SC, Fonseca CT, Cardoso FC, Farias LP, Leite LCC. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. Acta Trop. 2008;108:256–62.

Oliveira SM, Albuquerque MCPA, Pitta MGR, Malaquias E, Santana JV, Lima MCA, Pitta IR, Galdino SL. Avaliação da resposta do Schistosoma mansoni mantido in vitro frente a derivados imidazolidínicos. Acta Farm Bonaer. 2004;23:343-8.

Paraense WL. Fauna Planorbídica do Brasil. In: Lacaz, CS. Introdução a Geografia Médica do Brasil. São Paulo; Edgard Blücher do Brasil, 1972. p.213-239, 568 p.

Paraense WL. The nomenclature of Brazilian planorbids. III. Rev Bras Biol. 1963;23:1-7.

Pearce E.J. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. Ata Trop. 2003;86:309 -13.

Pitta MGR, Silva ACA, Neves JKAL, Silva PG, Irmão JI, Malaquias E, Santana JV, Lima MCA, Galdino SL, Pitta IR, AlbuquerqueMCPA. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101:313–6.

Pordeus, Cavalcanti L, Aguiar, Rafael L, Quinino, Macedo LR, Barbosa CS. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. Epidemiol Serv Saúde 2008;17(3):163-75.

Ribeiro-dos-Santos G, Verjovski-Almeida S, Leite LC C. Schistosomiasis—a century searching for chemotherapeutic drugs. Parasitol Res. 2006;99:505–21.

Ribeiro L, Carvalho RA, Ferreira DC, Veiga FJB. Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. Eur J Pharm Sci. 2005;24:1–13.

Rocha RS, Carvalho OS, Santos JS, Katz N. Tentativa de controle de *Hymenolepis nana* através de tratamentos clínicos repetidos, com praziquantel, em uma comunidade fechada. Rev Saúde Publica 1981; 15:364-370.

Rodrigues GC, Lacerda DC, Guimão ES, Colares FA, Mota VT. Forma pseudoneoplásica de esquistossomose pulmonar crônica sem hipertensão pulmonar. J Bras Pneumol. 2009; 35(5):484-488.

Rouquayrol MZ, Almeida-Filho N. Epidemiologia e Saúde. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. 708p.

Sales DM, Santos JEM, Shigueoka DC, Leão ARS, Neto RC, Borges DR, D'Ippolito G, Szejnfeld J. Correlação interobservador das alterações morfológicas das vias biliares em pacientes com esquistossomose mansoni pela colangiorressonância magnética. Radiol Bras 2009;42(5):277–82.

Sayed AA, Simeonov A, Thomas CJ, Inglese J, Austin CP, Williams DL. Identification of Oxadiazoles as New Drug Leads for the Control of Schistosomiasis. Nat Med 2008;14(4): 407–12.

Silva CMR. Perfil clínico e epidemiológico dos portadores de Mielorradiculopatia Esquistossomótica atendidos em uma unidade de saúde de Pernambuco [Dissertação] Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2008.

Soares S, Júnior VR, Silva DTN, Souza HM. Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(3):321-5.

The Synaptic Leap. Enantioselective Synthesis of Praziquantel 2006. Disponível em: <http://www.thesynapticleap.org/schist/projects>. [citado 2010 maio 19].

Trisin Y, Bronshtin AM. Advances in the development of new anthelminthics. Pharm Chem J Engl Trans. 1986;20:696-713.

Vennerstrom JL, Dong YX, Chollet J, Matile H, Padmanilayanan M, Tang YQ, Charman WN. Spiro and Dispiro 1,2,4-Trioxolane Antimalarials. U S Pat 2002; 26.

Yang Z, Wu W, Li Y, Wu Y. Design and Synthesis of Novel Artemisinin-Like Oxonides with Antischistosomal Activity. Helv Chim Acta 2005;88(11):2865-72.

Recebido em: 10/01/2011

Aceito em: 17/05/2011