



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



OBTENÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO
BENZNIDAZOL-CICLODEXTRINA EM SOLUÇÃO PARA O COMBATE DA
DOENÇA DE CHAGAS

MAGALY ANDREZA MARQUES DE LYRA

RECIFE

2010

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

**OBTENÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO BENZNIDAZOL-
CICLODEXTRINA EM SOLUÇÃO PARA O COMBATE DA
DOENÇA DE CHAGAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Co-orientador: Prof^o. Dr. Fábio Santos de Souza

MAGALY ANDREZA MARQUES DE LYRA

RECIFE

2010

Lyra, Magaly Andreza Marques de

Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas / Magaly Andreza Marques de Lyra. – Recife: O Autor, 2010.

xv + 103 folhas: il., fig. e tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Medicamentos. 2. Doença de Chagas. 3. Solubilidade. 4. Ciclodextrinas. 5. Benznidazol. I. Título.

615.3
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2010-072



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

Recife, 10 de fevereiro de 2010.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 10 de fevereiro de 2010 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Maria do Carmo Alves de Lima

(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Teresinha Gonçalves da Silva

(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos

**Dedico aos meus dois amores,
minha mãe Ladijane e meu noivo Jonathan,
com carinho,
pelo amor, apoio e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, o criador de todas as coisas, por toda sabedoria e providência fornecida durante todos os momentos desta jornada.

Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Pedro Rolim**, pelos ensinamentos, incentivo, apoio, amizade e carinho de pai científico, oferecidos durante várias etapas da minha vida acadêmica e pessoal.

À minha equipe de projeto **Danilo Augusto, José Lamartine, Ádley Antonini, Larissa Rolim e Fabiana Lícia** (amiga querida e companheira de longas datas), assim também à **Lariza Alves** (participante especial em nosso grupo). Sou muito grata a vocês, pois foram essenciais na execução desta pesquisa.

Aos meus amigos **LTM, Lourenço Neto, Thays Gomes, Alexandre Couto, Ana Flávia, Maria Luiza, Camila Tavares, Élica Rodrigues, Graziella Marques, Keyla Emanuelle, Amanda Vieira, Luíse Lopes, Marina Melo, Rosali Silva, Mônica Soares, Geisiane Presmich, Lívio César e Jeckson Luiz**.

Aos professores e colegas: Prof^ª. **Regina Bressan** e colaboradora **Jana Sandes** do Laboratório de Microbiologia do grupo Ageu Magalhães; Prof^ª. **Beate Santos** e colaboradores **Clayton Azevedo** e **Rayana Muniz** do Laboratório Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral/UFPE; Prof^º. **Mário Engelsberg** e colaborador **Rômulo Tenório** do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear; Prof^ª. **Miracy Muniz** e colaborador **Severino Grangeiro Júnior** do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos. Agradecemos pela colaboração e toda a ciência compartilhada com o nosso grupo de pesquisa.

Aos amigos queridos do Curso de Farmácia da UFPE, **Regina Meira, Alexandra de Paula, Patrícia Magalhães, Evelin Mirelly**, da HEBRON, **Wedja Pires, Eliane, Diogo e Magda Tirbutino**, do CEFET-PE, **Paulo Aires, Michele Santana e Juliana Vital** e da IECE, **Elaine Santana, Elilde Santana, Cláudia Maria, Andresa Karine, Saulo de Tarso, Paulo Leite, Ricardo Henrique, Elmison Junior, João Dasmasceno, Aparecida**

Freire (em especial ao meu paizão **Aurivan Marinho**) por todos os momentos de alegrias e amizade, e por todo o incentivo nesta caminhada.

Aos meus familiares, meus tios, **Josafá Lira, Elizabete Quaresma, Carlos Lira** e primas **Ester Marques e Eliziane Matoso**, em especial meu irmão **Luismar Lyra**, minha cunhada **Alessandra Lyra** e meus sogros **Sandra Ângela e Edinaldo Machado**, por todo apoio e atenção.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Para conseguir grandes coisas,
é necessário não apenas planejar,
mas também acreditar,
não apenas agir, mas também sonhar”

(Anatole France)

“Não vai demorar que passemos adiante
uma grande e bela ciência
que faz arte em defesa da vida”

(Carlos Chagas)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNZ	Benznidazol
CD	Ciclodextrinas
CI	Complexo de Inclusão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D ₂ O	Água Deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDI	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DR-X	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
HP-β-CD	Hidroxipropil-β-ciclodextrina
IC ₅₀	Concentração de Inibição de 50%
IV	Infravermelho
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Ministério da Saúde
MSF	Médicos Sem Fronteiras
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
RM- β-CD	Randomizada metilada- β-ciclodextrina
SBE- β-CD	Sulfabutíler- β-ciclodextrina
TGA	Análise Termogravimétrica

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	graus Celsius
nm	Nanômetro
M	Molar
λ	comprimento de onda
K_{obs}	Constante de degradação fotoquímica
K_c	Constante de complexação
S_o	Solubilidade intrínseca
Kg	Quilogramas
μg	Microgramas
ΔG	Variação de energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia
μm	Micrometro
$\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$	Joule por gramas
ΔE	Variação de energia
mM	Milimolar

LISTA DE FIGURAS

Artigo I

Figura 1. (1) Nifurtimox. (2) Benznidazol. Fonte: (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2008).....	12
Figura 2. Estruturas químicas do Lapachol e seus derivados (α -Lapachona e β -Lapachona).	15

Artigo II

Figura 1. Diagrama de Solubilidade para avaliação dos complexos de inclusão.	33
Figura 2. Fotografias da Microscopia Eletrônica de Varredura (Grupo I) microfotografia eletrônica de varredura do benznidazol (A), RM β CD (B), MF (C), MLX (D), LIO (E) e COE (F). (Grupo II) microfotografia eletrônica de varredura do benznidazol (G), SBE β CD (H), MF (I), MLX (J), LIO (L) COE (M).	44

Artigo III

Figura 1: Estrutura química do BNZ	57
Figura 2: Difratoograma de Raios-X do BNZ.....	60
Figura 3: Estrutura molecular tridimensional do BNZ.....	61
Figura 4: Curva de DSC do BNZ para verificação da faixa de fusão	62
Figura 5: Curva de DSC do BNZ para verificação de polimorfos	63
Figura 6: Espectro do BNZ no IV e pela técnica de Raman.....	65
Figura 7: Fotomicrografias por MEV dos cristais do BNZ.	66
Figura 8: Perfil de dissolução do BNZ.....	67

Artigo IV

Figura 1. (A) Estrutura química do BNZ e (B) da ciclodextrina natural β CD (R = H) e RM β CD (R = CH ₃), (C) representação do complexo de inclusão BNZ:CD.	75
Figura 2. Varredura espectrofotométrica do BNZ em água.	81
Figura 3. Diagrama de solubilidade de fase do BNZ com diferentes CDs em água a 25°C.	82

- Fig. 4. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do BNZ (0.8 mM), RM- β -CD e BNZ: RM- β -CD (proporção molar 1:1). Amostras em D_2O at 25° C. Picos marcados com asterisco (*) são devido à rotação do spin. 86
- Fig. 5. Espectro de ^1H RMN (300 MHz) do BNZ (0.8 mM), β -CD e BNZ: β -CD (proporção molar 1:1). Amostras em D_2O at 25° C. Picos marcados com asterisco (*) são devido à rotação dos spins..... 86
- Fig. 6. Job's plots correspondendo ao deslocamento químico de hidrogênios (a) BNZ e da (b) RM- β -CD (Ha)..... 87
- Fig. 7. (A) Variação dos deslocamentos químicos de hidrogênios do BNZ (H-4, H-3 e H-5), plotados em função da fração molar. (B) Variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios (H-2 e H-1), plotadoa em função da fração molar..... 88
- Fig. 8. Variação do tempo de retenção na presença de RM- β -CD (0,8 mM) a 25°C. Condições cromatográficas: coluna: Shimadzu®, C_{18} , 5 μm , 15 cm \times 0.46 cm, fase móvel: acetonitrila/água (50/50, v/v)..... 89
- Fig. 9. Perfis de fotodegradação do BNZ e do complexo BNZ:RM- β -CD sob fotoexposição de radiação em solução aquosa..... 91
- Fig. 10. Porcentagem de inibição do crescimento de forma epimastigotas de *T. cruzi* com a determinação da IC_{50} após 48 horas de cultivo do BNZ ($\text{IC}_{50} = 0,037$ mM) e do complexo BNZ: RM- β -CD ($\text{IC}_{50} = 0,027$ mM). Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata..... 92
- Fig. 11. Efeitos citotóxicos do BNZ, BNZ: RM- β -CD e RM- β -CD nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,1 e 0.2 mM em células de macrófagos incubadas por 48 h a 37°C e 5% CO_2 . Dados expressados em % de viabilidade celular (cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 4 experimentos). *** Significância estatística com $p < 0,05$ (one-way ANOVA). 93

LISTA DE TABELAS**Artigo I**

Tabela 1. Resultado da Busca dos recursos investidos em “doença de Chagas”: 2002-2008.	22
Tabela 2. Resultado da Busca dos recursos investidos em “benznidazol”: 2005-2006.	22
Tabela 3. Resultado da Busca dos projetos com “benznidazol”: 2005-2006.	22
Tabela 4. Publicações por autores brasileiros nas sete doenças do programa de P&D em doenças negligenciadas.....	23

Artigo IV

Tabela 1. Constantes aparente de complexação ($K_{1:1}$) e parâmetros termodinâmicos da complexação do BNZ com CDs determinada pelo diagrama de solubilidade de fases, 25°C.	83
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivos Específicos	5
Capítulo I	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Artigo I - Doença de Chagas: Cem anos de descoberta.....	7
3.2 Artigo II . Ferramentas Analíticas Aplicadas à Caracterização de Complexos de Inclusão Fármaco-Ciclodextrina	29
Capítulo II	54
4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA PRIMA BENZNIDAZOL	54
4.1 Artigo III - Caracterização Físico-Química do Tripanomicida Benznidazol para o Desenvolvimento de Medicamentos.....	55
Capítulo III	71
5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO (CICLODEXTRINA E BENZNIDAZOL) EM SOLUÇÃO	71
5.1 Artigo IV – Investigação do complexo benznidazol-ciclodextrina: Uma nova perspectiva no tratamento da doença de Chagas	72
6 CONCLUSÕES	99
7 PERSPECTIVAS	101
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade endêmica na América Latina que acomete aproximadamente 9,8 milhões de pessoas, sendo classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença negligenciada (mais prevalente nos países em desenvolvimento). A quimioterapia atual para essa doença ainda se baseia no único fármaco de escolha, o benznidazol (BNZ), mesmo sendo muito tóxico e de baixa solubilidade. As ciclodextrinas (CD) têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, as quais promovem incremento na solubilidade de fármacos poucos solúveis. Estas melhorias nas propriedades físico-químicas das moléculas encapsuladas podem ser identificadas através de diversas metodologias analíticas que permitem detectar a formação dos complexos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar e caracterizar a formação de complexos de inclusão (CI) entre o BNZ e as CDs em solução aquosa. Foram utilizados CD naturais (α, β, γ) modificadas (metilada e randomizada). A formação do complexo foi avaliada pelo diagrama de solubilidade de fases, estudos de ressonância magnética nuclear e estudos de fotoestabilidade. A atividade tripanocida *in vitro*, bem como a citotoxicidade em células de mamíferos foram também investigados tanto para o BNZ como para os complexos. O diagrama de solubilidade de fases observado foi do tipo A_L , evidenciando a formação de CI de inclusão solúveis de estequiometria 1:1, confirmada pelo método de variação contínua (Job's plot). Na avaliação da fotoestabilidade, os dados obtidos indicaram que a CD modificada (RM- β -CD), a qual apresentou o maior incremento de solubilidade, retardou a fotodegradação do BNZ. Os ensaios de citotoxicidade mostraram que os CI foram capazes de diminuir os efeitos tóxicos causados pelo BNZ e que a atividade tripanocida do fármaco não foi alterada pela complexação. Neste sentido, a complexação do BNZ com a CD é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica líquida, segura e eficaz para o combate a doença de Chagas.

PALAVRAS CHAVE: Doença de Chagas, Solubilidade, Ciclodextrinas, Benznidazol.

ABSTRACT

Chagas disease is illness endemic in Latin America that affects approximately 9.8 million people and It is classified by World Health Organization as a neglected disease (more prevalent in development countries).The Current chemotherapy for this illness is still based on benznidazole (BNZ), which is very toxic and has low solubility. The cyclodextrins (CDs) have been must used in pharmaceutical products development, particularly to your properties of complexation, mainly for the increase the solubility of solubility poorly. These variations physical-chemical properties of the molecules guests are identificaded using analytic methodologies that allow to detect the formation of the complexes. The objective of this study was to investigate and characterize the formation of inclusion complexes (IC) between the BNZ and CDs in aqueous solution. Natural cyclodextrins (γ , α , β) had been used beyond derivatives of the β -cyclodextrins (randomized and methylated). The complex formation was evaluated by the phase solubility diagram, nuclear magnetic resonance and photostability assay. The *in vitro* trypanocidal activity, as well as the cytotoxicity against mammal cells of both BNZ and complexes was also investigated. The phase-solubility diagram displayed an A_L type feature, evidencing the formation of soluble IC. The continuous variation method (Job's plot) showed the existence of a complex with 1:1 stoichiometry. In the evaluated of photostability, the results shown that the CD derivatives (RM- β -CD), evidenced the higher increase in solubility, decrease the photostability of BNZ. The toxicity assays demonstrated that inclusion complexes were able to decrease the toxic effects caused by BNZ alone and that no interfered with the trypanocidal activity of the BNZ. In this sense, the use of CI (BNZ: CD) is a promising alternative for the development of a liquid formulation, safe and stable, and a new therapeutic option for the treatment of Chagas disease.

KEYWORDS: Chagas disease, Solubility, Cyclodextrins, Benznidazole.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase humana sul-americana ou doença de Chagas é uma doença negligenciada. Estima-se que a prevalência global da doença de Chagas seja de 9,8 milhões de pessoas infectadas. A batalha contra esta doença, resultado da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, já obteve êxitos na interrupção da transmissão vetorial e transfusional da doença na maioria dos países endêmicos, contudo, estas pessoas infectadas ainda não dispõem de um tratamento medicamentoso adequado (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006).

Desde a descoberta da doença em 1909 por Carlos Chagas inúmeros agentes quimioterápicos já foram e estão sendo testados por cientistas de todo o mundo, estes têm trabalhado no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento desta doença, da descoberta de novos alvos bioquímicos ao desenvolvimento de novas moléculas com potencial de ação anti-*trypanosoma cruzi* (COURA & CASTRO, 2002).

Apesar de não ser o fármaco ideal, o benznidazol é atualmente o fármaco de escolha para o tratamento desta doença. O conhecimento aprofundado sobre o fármaco e técnicas mais eficazes de vetorização do mesmo em formas farmacêuticas poderá possibilitar o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, disponibilizando para a população em um curto espaço de tempo e com menor custo quando comparado a uma nova molécula a ser introduzida na terapêutica (DOCAMPO, 2001).

A solubilidade dos fármacos aos fluídos biológicos também se faz uma das mais importantes barreiras à eficácia do medicamento. Fármacos que apresentam baixa solubilidade aquosa, como o benznidazol (BNZ), apresentam dificuldades de absorção e conseqüentemente de exercerem a sua ação farmacológica. Diversas técnicas já empregadas na prática acadêmica e industrial que possibilitam por meio de diferentes processos o incremento da solubilidade do fármaco, entre estes se podem citar a complexação de fármacos com ciclodextrinas (FRANCO et al., 2009).

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose, onde a presença das hidroxilas livres na parte externa das CDs confere a essas

moléculas um caráter hidrofílico. Esse arranjo estrutural das moléculas de glicose nas CDs possibilita a utilização desses compostos como hospedeiros na formação de complexo de inclusão (CI). A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a “solubilização” em meio aquoso de compostos de baixa solubilidade. Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização de CDs em diferentes áreas da ciência e tecnologia, sendo o principal domínio de aplicação à indústria farmacêutica (BRITTO, JÚNIOR & SANTOS, 2004).

As propriedades físico-químicas do fármaco e da CD livre são relativamente diferentes das que possuem estes compostos quando estão complexados. Em solução, estabelece-se um equilíbrio entre as moléculas hóspedes complexadas e não complexadas. Entre todas as propriedades das moléculas hóspedes que se pretendem alterar por complexação com CDs, a solubilidade é sem dúvida aquela que mais interessa em termos de aplicações farmacêuticas (RIBEIRO, 2005).

As fracas interações que ocorrem entre a molécula complexada e a CD, característica intrínseca do sistema molecular, dificultam a utilização de algumas técnicas analíticas aplicadas à solução (BRITTO et al., 2004), mas variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser identificadas através de algumas ferramentas analíticas, que permitam detectar a formação dos complexos. A maioria dos estudos de caracterização de CI com CDs em solução são por espectroscopia de absorção UV-Vis, técnica de fluorescência e espectroscopia de RMN H^1 (FRANCO et al., 2009; MILLER, CARRIER & AHMED, 2007).

Dentre as linhas de pesquisa envolvendo o BNZ, o desenvolvimento de uma formulação líquida, através de diferentes alternativas tecnológicas como os CI, visa introduzir na terapêutica mundial, novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas, sempre associando os preceitos da Tecnologia Farmacêutica às necessidades de produção de medicamentos com qualidade, segurança e eficácia, fazendo com que o acesso da população infectada ao medicamento seja ampliado.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obtenção e caracterização de complexos de inclusão do fármaco benznidazol com ciclodextrinas para incrementar a taxa de solubilização deste fármaco em solução.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a matéria-prima benznidazol;
- Obter complexos de inclusão em solução de benznidazol com ciclodextrinas;
- Realizar estudo de solubilidade de fases;
- Caracterizar os complexos de inclusão através de diferentes técnicas analíticas;
- Realizar estudo de fotoestabilidade do fármaco e dos complexos de inclusão em solução aquosa;
- Avaliar a atividade tripanocida e a citotoxicidade dos complexos.

Capítulo I

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigo I - **Doença de Chagas: Cem anos de descoberta**

Artigo publicado: Revista Brasileira de Farmácia

3.2 Artigo II - **Ferramentas Analíticas Aplicadas a Caracterização de Complexos de Inclusão Fármaco-Ciclodextrina**

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

3.1 Artigo I - Doença de Chagas: Cem anos de descoberta

Chagas disease: 100 years of discovery

Magaly Andreza Marques de Lyra², José Lamartine Soares Sobrinho¹, Danilo Augusto Ferreira Fontes², Mônica Felts de La Roca Soares^{1,2} & Pedro José Rolim Neto²

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí – UFPI

²Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM – Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade endêmica na América Latina que acomete aproximadamente 9,8 milhões de pessoas após cem anos de sua descoberta. Atualmente, a doença de Chagas é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada (mais prevalente nos países em desenvolvimento) e que não dispõe de tratamentos eficazes ou adequados. A busca por alternativas ao combate à doença de Chagas tem sido registrada ao longo desse tempo por pequenos grupos, contudo, tem-se apenas o benznidazol disponível em território nacional como agente terapêutico. Diante disso, este trabalho objetivou traçar um panorama situacional da doença de Chagas, enfocando as ações no combate à parasitose, epidemiologia da doença, mercado de medicamentos, tratamentos utilizados, novos fármacos, tecnologia farmacêutica aplicada a fármacos já utilizados, além das políticas e ações governamentais integradas.

PALAVRAS CHAVE: Benznidazol, Doença de Chagas, Doenças negligenciada.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease is a illness endemic in Latin America that affects approximately 9.8 million people after one hundred years its discovery. Currently, Chagas' disease is classified by World Health Organization (WHO) as a neglected disease (more prevalent in development countries) and that has no effective treatments or appropriate. The search for alternatives to combat Chagas' disease has been reported during that time by small groups, however, only the benznidazole is available in national territory. Thus, this study aimed to verify the Chagas disease situational, focusing on actions to combat the parasite, disease epidemiology, market for drugs, treatments used, new drugs, technology applied to pharmaceutical drugs already used in addition to government policies and actions integral.

KEYWORDS: Benznidazole, Chagas disease, Neglected disease.

INTRODUÇÃO

Em fevereiro de 1909, o médico sanitarista Carlos Chagas, após isolar o parasito *Tripanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida, conclui todo o ciclo biológico da doença e posteriormente a identificação do vetor. Em sua homenagem foi denominada doença de Chagas. Essa descoberta é considerada até hoje, única na história da ciência e saúde brasileira ¹.

A doença de Chagas é uma enfermidade endêmica na América Latina, afetando em torno de 10 milhões de pessoas. A doença continua sendo um grave problema de saúde pública na América Latina, onde se estima que 4% a 5% da população possa estar infectada pelo *T. cruzi*. Minas Gerais é considerado um dos Estados brasileiros com maior prevalência da endemia chagásica, tendo sido coincidentemente o palco da descoberta da doença ².

Atualmente, a doença de Chagas é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada, devido à proposta de classificação das doenças

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

em globais (ocorrem em todo o mundo), negligenciadas (mais prevalentes nos países em desenvolvimento) e mais negligenciadas (exclusivas dos países em desenvolvimento). Essas denominações representam uma evolução do termo "doenças tropicais" por contemplar os contextos de desenvolvimento político, econômico e social³.

Ações ao longo desses cem anos ações têm sido tomadas no combate à enfermidade. O combate à doença existe, porém o conhecimento produzido, ainda, não se reverteu de forma efetiva em avanços terapêuticos, como por exemplo, novos fármacos, métodos de diagnósticos e/ou vacinas, apontando a necessidade de institucionalizar mecanismos que levem os produtores a desenvolver pesquisas para o tratamento de doenças próprias da realidade sanitária dos países pobres⁴.

Ao enfrentar a escassez ou falta de um tratamento adequado para essas doenças, países atingidos por essas endemias têm, em sua população um custo elevado em decorrência das co-morbidades trazidas por essas enfermidades. Como por exemplo, no Brasil, os custos anuais sociais da doença de Chagas chegam próximo a 1 bilhão de reais⁵.

Diante do exposto, o trabalho objetivou traçar um panorama situacional da doença de Chagas, enfocando as ações no combate a parasitose, discutindo aspectos tais como: epidemiologia da doença, mercado de medicamentos, tratamentos utilizados, novos fármacos, modelos de avaliação de ativos, tecnologia farmacêutica aplicada a fármacos já utilizados, além das políticas e ações governamentais integradas.

EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

As doenças negligenciadas afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças tropicais infecciosas que atingem principalmente pessoas de baixa renda, como exemplo, a doença de Chagas na América Latina, que gera um impacto devastador sobre a humanidade⁶.

Em torno de 1 bilhão de pessoas, um sexto da população mundial, sofre de uma ou várias doenças negligenciadas. Na América Latina, a doença de Chagas, transmitida pelo *T.*

cruzi, popularmente conhecido como tripanossoma americano, é considerada uma das mais importantes infecções parasíticas, abrangendo do México até a Argentina ⁷.

As tripanossomíases são mais comuns em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Mas como essas infecções parasíticas acometem muitos pacientes imunocomprometidos, são também encontradas em países desenvolvidos ⁸.

Os dados epidemiológicos nos mostram que no início de 1980, o número estimado de infectados era de 16 a 18 milhões, com uma incidência anual de 300 000 casos. Já em 2007, os valores citados foram 8 milhões de infectados com 50 000 novos casos por ano e 14 000 mortes relacionadas a complicações da doença ^{9,10}.

Em diversas áreas do sul da América do Sul, a incidência nos últimos 10 a 15 anos da transmissão por *T. cruzi* em pessoas vem reduzindo-se com declínio de aproximadamente 73% ¹¹. Na Colômbia, estima-se que quase 5% da população esteja infectada e, que cerca de 20% está em perigo de adquirir a doença ¹².

A luta contra a doença de Chagas é baseada principalmente no combate ao seu vetor. A batalha pela interrupção de sua transmissão vetorial e transfusional já obteve êxito em países endêmicos como Chile, Uruguai e Brasil. No que diz respeito aos países andinos e da América Central, o combate à doença parasitária é menos avançado, dificultado pelo elevado número de espécies vetores ¹³.

Existem centenas de espécies conhecidas de triatomíneos, mas poucos têm um papel evidente na transmissão aos seres humanos. *Triatoma infestans* é uma das espécies antropofílica que participa da transmissão do parasito nos países do Cone Sul (Brasil, Chile, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia) ^{5,10}.

Além dos vetores, existem espécies animais, selvagens e domésticas, que servem de reservatório para o parasito. Um inseto não infectado ao picar um desses animais torna-se capaz de transmitir a doença ^{14,15}.

Em áreas endêmicas, a infecção pelo *T. cruzi* tem acontecido geralmente após o contato com as fezes de triatomíneos sugadores de sangue, por transmissão congênita, por transplante de órgãos e transfusão sanguínea ¹⁶. Com a migração maciça das zonas rurais para as zonas urbanas na América Latina, a transmissão transfusional e congênita são mais

observadas em zonas onde a transmissão vetorial foi eliminada¹⁷. A transmissão também é possível através de plaquetas, plasma, crioprecipitado e aglomerados de células brancas do sangue¹⁰.

A doença não está confinada apenas na América do Sul, com a imigração internacional, estima-se que 700.000 pessoas infectadas estejam vivendo fora do continente americano. Casos recentes na Europa, sobretudo na Espanha, devido às migrações da América Latina, as transmissões têm sido descritas por transfusão, transmissão congênita e transplante^{18,19}. Outros países da Europa, em menor proporção, depararam-se com esta nova realidade, como é o caso da Suíça, Itália e França, que tem vários casos diagnosticados entre os bolivianos migrantes nos últimos anos²⁰.

DOENÇAS NEGLIGENCIADAS X MERCADO DE MEDICAMENTOS

As doenças negligenciadas é um problema global de saúde pública, contudo, os centros de pesquisa e desenvolvimento (P&D) das indústrias farmacêuticas são quase sempre focados nas doenças globais, para as quais medicamentos podem ser produzidos e comercializados com geração de maiores lucros. Com baixo poder aquisitivo e sem influência política, os pacientes e sistemas de saúde de países subdesenvolvidos não conseguiriam gerar o retorno financeiro exigido pela maior parte das empresas que desenvolvem medicamentos⁴.

Além disso, medicamentos atualmente disponíveis são de difícil acesso a alguns países menos desenvolvidos e, observa-se uma crescente resistência da enfermidade com o seu uso na terapêutica².

Entre 1975 e 2004, apenas 21 medicamentos foram registrados para doenças tropicais, constituindo estas, mais de 11% da carga global de doenças. Durante o mesmo período, para outras doenças foram registrados 1.535 medicamentos^{6,21}.

Vários centros de pesquisas e órgãos de saúde, como Instituto Pasteur – França; Instituto de Pesquisa Médica do Quênia – Quênia; Ministério da saúde da Malásia – Malásia; Médicos sem fronteiras – Internacional; Fundação Oswaldo Cruz – Brasil, Centro de Otimização de Candidatos a Medicamentos, Epichem (Austrália), Universidade de

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Murdoch (Austrália), Universidade Federal de Pernambuco (Brasil) e Universidade Federal de Ouro Preto (Brasil), se empenham, tanto para melhora do tratamento atual, quanto para criação de novos fármacos, com planos de ação para garantir que novos medicamentos sejam desenvolvidos e os que já existem para o tratamento de doenças negligenciadas, em especial a doença de Chagas, possam se tornar acessíveis à população²².

Entre os medicamentos encontrados no mercado para o tratamento da doença de Chagas (Fig. 1), o nifurtimox teve seu uso interrompido, por apresentar muitos efeitos secundários, tendo apenas o benznidazol (BNZ) disponível no mercado, ainda com uma série de restrições, como: baixa eficácia na fase crônica da doença, significativas variações regionais na eficácia devido ao surgimento de resistência do *T. cruzi*, alta taxa de abandono do tratamento devido aos efeitos colaterais causados pelos medicamentos, longo período de tratamento (30 a 60 dias) e a inexistência de formulação pediátrica, mas ainda assim, ele é considerado o fármaco de escolha^{24,25}.

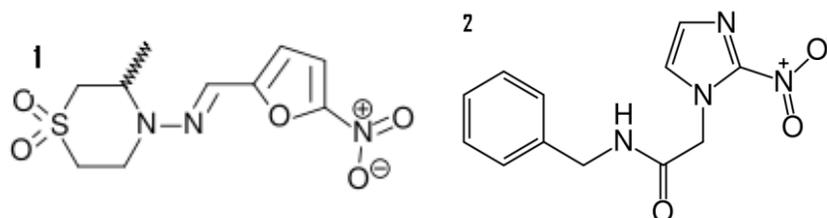


Figura 1. (1) Nifurtimox. (2) Benznidazol. Fonte: (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O órgão internacional *DNDi* (sigla em inglês para iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas - *Drugs for Neglected Diseases initiative*), cujo objetivo é criar e estimular esforços para a Pesquisa e o Desenvolvimento (P&D) de medicamentos para as doenças negligenciadas, como a doença de Chagas²¹, visa em seu portfólio de projetos, o desenvolvimento da primeira formulação de BNZ pediátrico, assinando acordo com o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), atual detentor da patente do benznidazol²⁶.

Embora as perspectivas em relação à P&D de medicamentos para as doenças negligenciadas tenham melhorado a partir de 2003, as necessidades dos pacientes nos países em desenvolvimento ainda estão longe de serem atendidas. Aproximadamente 3,1 mil pacientes com Chagas foram tratados pelos médicos sem fronteiras (MSF) e apenas cerca de 2,8 mil finalizaram o tratamento com êxito²⁷.

TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

A tripanossomíase americana continua sendo um problema de saúde pública significativa e o potencial terapêutico dos agentes antichagásico é ainda muito limitado²⁵.

No tratamento da doença de Chagas dispõe-se apenas do BNZ. Estudos mostraram que utilizando a dose na fase aguda de 5 a 7 mg/kg, 2 vezes ao dia, durante 60 dias, obtem-se 60 à 70% de curas parasitológicas, tendo como principal efeito secundário, a dermatite alérgica que pode acompanhar-se de sinais gerais. Sua limitação é para crianças e lactentes, pois não existe apresentação pediátrica¹⁰.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, estas infecções parasíticas são parte de um grupo de doenças negligenciadas, em que a quimioterapia ainda precisa ser melhorada dentro das “janelas” terapêuticas (extensão de tempo em que a concentração do medicamento oferece o desejado efeito: quando reduzida, o efeito está aquém do desejado e, quando acima, aparecem os efeitos tóxicos)²⁸.

FONTES DE NOVOS FÁRMACOS

O desenvolvimento de fármacos antiparasitários pode surgir através de experimentos com produtos naturais ou sintéticos que tenham similaridade com compostos com reconhecida atividade para outras doenças ou através de alvos metabólicos específicos para um determinado parasita que se quer atingir²⁹. Como perspectivas para o tratamento experimental da doença de Chagas, vários alvos estão sendo descobertos através de estudos

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

metabólicos e bioquímicos do *T. cruzi*, entre os quais, a síntese de esteróis e enzimas essenciais ao desenvolvimento e multiplicação desse parasita³⁰.

Os difundidos na natureza podem ser isolados de fungos, de plantas superiores, de organismos marinhos e de mamíferos, como exemplo os alcalóides β -carbolínicos, mostrando uma considerável atividade parasiticida contra o *T. cruzi*³¹.

Vários outros compostos naturais e sintéticos foram testados para identificar agentes com efeitos inibitórios e/ou tóxicos em *T. cruzi*. Entre eles, alcalóide piperina, lignanas grandisinas e veraguensinas tetraidrofurânica, flavonóides 5,4 - dihidroxi-7-metoxiflavonona e 5,4-dihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona, e compostos aromáticos sintéticos bisfosfonatos e diamidinas que demonstraram atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas e/ou amastigotas²⁵.

As diamidinas aromáticas mostraram-se promissoras como futuros agentes eficazes no tratamento de diversas infecções parasitárias, incluindo o *T. cruzi*. Entre elas, a pentamidina é o único composto desta classe que foi significativamente usado em seres humanos⁸.

A lignana tetraidrofurânica na sua biotransformação conduziu à formação de um novo metabólito caracterizado como 3,4-dimetil-2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetoxifenil)-5-metoxi-tetraidrofurano. O metabólito foi analisado contra o parasita *T. cruzi*, demonstrando atividade tripanomicida similar ao precursor natural³².

Diversas plantas têm se apresentado como rica fonte de substâncias com atividade contra as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi* e, se mostram como uma das direções promissoras na busca de fármacos eficazes na prevenção e tratamento da doença de Chagas. Dentre os compostos encontrados nas plantas, as quinonas, flavonóides, alcalóides, terpenos e xantonas presentes nos vegetais, foram testados para avaliar alguma atividade contra as diferentes formas do parasito³³.

As naftoquinonas representam uma importante classe de produtos naturais, com uma grande variedade de atividades biológicas, das quais se podem citar as atividades antiparasitárias³⁴. O lapachol e seus derivados (Fig. 2) são exemplos de naftoquinonas presentes em várias espécies vegetais, os quais apresentaram atividade contra as formas

amastigota, epimastigota e tripomastigota do parasito. O seu derivado de transformação química, a 3-alil- β -lapachona, foi ativo contra formas tripomastigotas e tem sido sugerido como uma droga alternativa para o uso em bancos de sangue. Além disso, a epoxi- α -lapachona, um derivado da α -lapachona, apresentou um perfil de baixa toxicidade e uma significativa atividade inibitória contra as formas epimastigota e amastigota do *T. cruzi*²⁸.

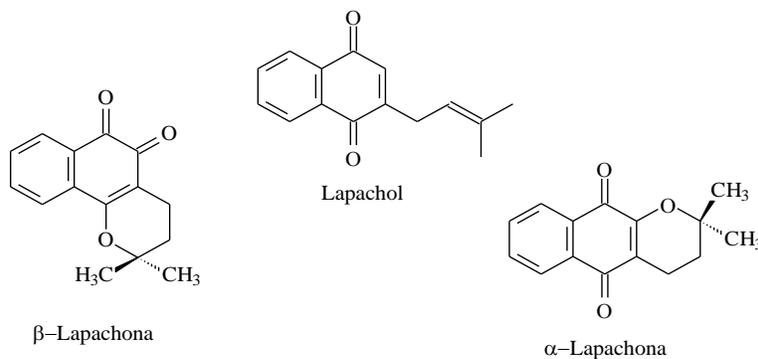


Figura 2. Estruturas químicas do Lapachol e seus derivados (α -Lapachona e β -Lapachona).
Fonte: (ALVES, 2004)

PESQUISAS EM ANDAMENTO / SÍNTESE DE NOVOS FÁRMACOS / NOVOS MODELOS *IN VITRO* X *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS

Novos fármacos seguros e eficazes contra infecções parasitárias são de extrema necessidade. Atualmente, muitos deles em uso no tratamento, apresentam vários problemas de toxicidade, eficácia variável, falta de biodisponibilidade e a necessidade de administração parenteral. Além disso, devido à resistência aos fármacos, tem que se visar caminhos bioquímicos no parasito, que não traga efeitos secundários para os pacientes⁸.

Pesquisas realizadas em busca de novos agentes antichagásicos têm sido feitas também entre as fitoalexinas, substâncias naturais produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa contra bactérias, fungos e insetos. Entre os metabólitos secundários produzidos pelo vegetal *Cruciferous*, as fitoalexinas apresentaram efeitos antitripanossomal, demonstrando propriedades antiproliferativa significativa nas formas amastigotas

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benzimidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

intracelular do *T. cruzi*, sendo então uma perspectiva de ser um candidato para o desenvolvimento de fármaco antichagásico ²⁵.

Os compostos derivados de tetrahydro-1-benzazepino foram investigados sinteticamente e farmacologicamente contra os tripanossomas. Compostos que contêm esta unidade heterocíclica possuem uma larga escala de atividades biológicas e alguns desses derivados têm sido obtidos com a possibilidade de serem agentes antitripanossomal quando usados como inibidores da diidrofolato redutase, enzima do *T. cruzi* ³⁶.

Paula et al. ²⁴, obtiveram vários derivados do 5-nitro-heterocíclico, nitrocompostos, os quais apresentaram atividade de inibição sobre o crescimento da forma epimastigota, sendo relevante por devido a uma avaliação preliminar do efeito antiproliferativo do agente antichagásico.

Considerando que o ergosterol é o principal esterol do *T. cruzi*, na última década, as pesquisas vêm sendo orientadas para o desenvolvimento de um inibidor eficaz desse esterol, e assim, neste parasito, etapas da biossíntese de esteróis que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos têm sido intensamente estudadas como alvo quimioterápico ¹².

A verificação da atividade tripanossomicida de cumarinas e estiril-2-pironas obtidos dos extratos da *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) contra as formas epimastigota, tripomastigota sanguínea e amastigota de *T. cruzi* foram avaliadas *in vitro*, mostrando potente ação tripanocida sob as formas epimastigotas ³⁷. Assim, também foi demonstrado com o ácido úsnico, isolado dos extratos da *Cladonia substellata*, a sua atividade contra epimastigotas do *T. cruzi* em concentrações de 5 a 30 µg/mL ³³.

Uma nova série de derivados de tiosemicarbazona e aminoacil-tiazolidonas foi sintetizada por Leite et al ³⁸. As estruturas químicas sugerem que estes compostos possam ter atividade anti-*T. cruzi*. A avaliação biológica indica que alguns destes compostos são capazes de inibir o crescimento de *T. cruzi* em concentrações não citotóxicas para células de mamíferos ³⁸.

Diante da extensa lista de diferentes classes de compostos que apresentaram atividade *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*, somente alopurinol, itraconazol, fluconazol e

posaconazol foram submetidos a ensaios clínicos desde a introdução do nifurtimox e do BNZ. Este fato se deve em muitos casos à inexistência da indicação do efeito potencial tóxico e/ou teratogênico (em geral somente analisado em modelos *in vitro*), enfatizando a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais mais adequados, bem como a padronização de protocolos de ensaio *in vitro*, para chegar-se a um fármaco que possa ser posteriormente submetido a ensaios clínicos ³⁹.

Os dados divulgados pelo *DNDi*, informaram que o planejamento do desenvolvimento de novas opções de tratamento para a doença de Chagas, desde a otimização de moléculas na fase inicial do *screening* à realização de testes em modelos *in vivo*, especialmente camundongos e cães, para avaliação da eficácia e segurança dos compostos. Entre eles os compostos azólicos, são os mais novos candidatos para desenvolvimento pré-clínico e clínico ⁴⁰.

Diante das formas indeterminadas e complicações tardias da doença de Chagas, a legitimidade do tratamento etiológico tem sido alvo de muitas discussões. Estudos têm sido realizados em animais e indivíduos infectados, com o objetivo de avaliar o tratamento com BNZ. Nos animais, o tratamento preveniu o desenvolvimento de doença cardíaca grave, apesar da erradicação incompleta do parasito. Nos indivíduos houve uma redução no risco de progressão de ataques cardíacos e o aumento da percentagem no negativismo de sorologia, sem os efeitos secundários graves observados ¹⁰.

Testes realizados com derivados de nitro-2-furil apresentaram uma excelente atividade anti- *T.cruzi* frente ao nifurtimox, verificado através de estudo em animais saudáveis com administração por via oral e intraperitoneal. De acordo com a porcentagem da sobrevivência dos animais, resultados histológicos, bioquímicos e hematológicos, três derivados do nitro-2-furil foram selecionados para serem testados *in vivo* como agentes antichagásicos. Após análise da relação entre a estrutura química e a toxicidade aguda anti- *T. cruzi*, o derivado 4-hexil-1-3-5-tri-nitro-2-furil-2-propinilideno apresentou melhor atividade antiparasítica e menor toxicidade ⁵.

Estudos realizados com pacientes crônicos submetidos ao tratamento com BNZ revelaram que somente um pequeno percentual dos pacientes tratados evoluiu para a

forma grave da cardiomiopatia chagásica crônica, reforçando a idéia de que o tratamento pode alterar a evolução para esta forma. Já os estudos com jovens crônicos tratados com o BNZ demonstraram cerca de 60% de negatização da sorologia e que todos ficaram menos vulneráveis a desenvolver danos cardíacos em relação ao grupo não tratados ⁴¹.

As alternativas de tratamento atual na doença de Chagas são poucas, apresentando eficácia clínica variável, mas até hoje ainda não foi desenvolvida nenhuma opção terapêutica efetiva. Um número de novos fármacos foi relatado por serem eficazes contra o *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo*, mas nenhum foi considerado completamente satisfatório ^{31,33}.

TECNOLOGIA FARMACÊUTICA X BENZNIDAZOL

O BNZ é um derivado de 2-nitroimidazol (Fig. 1 (2)) com importante estrutura química medicinal, que mostra um largo espectro de atividade farmacológica, principalmente no tratamento da doença de Chagas. Um dos mecanismos de ação relatado é relacionado à redução do metabolismo do parasita, pois utiliza o NADH-dependente mitocondrial para a sua ativação como um pró-fármaco ⁴².

Apesar do BNZ não ser o fármaco ideal, devido à sua toxicidade, além da baixa solubilidade em água, ele é o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas. O uso de alternativas tecnológicas, como a obtenção de complexo de inclusão com as ciclodextrinas, tem sido particularmente usada devido às suas propriedades complexantes, por aumentar a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis e conseqüentemente sua biodisponibilidade ⁴³.

Outra técnica utilizada pelos pesquisadores na área da tecnologia farmacêutica é a obtenção de dispersões sólidas, utilizando carreadores solúveis em água, como os polímeros hidrofílicos, o polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG), que têm sido largamente empregados nestes sistemas devido aos seus baixos custos e alta solubilidade em água ⁴⁴.

Lima ⁴⁴ verificou a contribuição dos sistemas de dispersões sólidas e complexos de inclusão no incremento da taxa/velocidade de dissolução do BNZ, com perspectivas de desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes e menos tóxicas para o paciente chagásico.

Neste direcionamento, Lamas et al. ⁴⁵ delineou lipossomas que carregam o BNZ com a finalidade de desenvolver uma forma farmacêutica que permitisse superar a baixa solubilidade do BNZ em meio aquoso. Desse modo, seria possível aumentar a seletividade e reduzir a toxicidade do fármaco, contudo o método carrega como desvantagem a necessidade da administração por via endovenosa, o que representa um incômodo em tratamentos diários e prolongados. Outra desvantagem está relacionada com a viabilidade comercial de tal forma farmacêutica, uma vez que seu custo é consideravelmente mais elevado. Por se tratar de um medicamento destinado a uma doença negligenciada, o custo do produto final está relacionado com o acesso da população a esta alternativa terapêutica.

Outra estratégia para melhoria de eficácia biológica de fármacos é a obtenção de complexos de metais com ligantes ativos como verificado no complexo de rutênio e aril-4-oxotiazolilhidrazonas, os quais foram submetidos a ensaios *in vitro* contra formas epimastigota e tripomastigota e avaliação da citotoxicidade em mamíferos ⁴⁶.

Abordagens como a veiculação em outras formas farmacêuticas também já foram propostas e estão em fase de desenvolvimento, tendo como exemplo formulação de suspensão e composições dose-fixa-combinada, associações de diferentes ativos numa única preparação ⁴⁷.

POLÍTICAS E AÇÕES GOVERNAMENTAIS NO COMBATE A DOENÇA DE CHAGAS

O Ministério da Saúde (MS), por intermédio das Secretarias de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos DECIT / (SCTIE) e de Vigilância em Saúde (SVS), e o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), por meio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) vem promovendo, desde 2003, Oficinas de Prioridades

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

para definir temas de pesquisas em acordo com as necessidades da população brasileira. Essas oficinas, para definição de prioridades, são realizadas com a participação de gestores, pesquisadores e profissionais da área de saúde e têm por objetivo nortear as chamadas públicas realizadas pelo Ministério da Saúde em parceria com o Ministério da Ciência e Tecnologia, Fundações de Amparo à Pesquisa (FAP) e Secretarias Estaduais de Saúde e de Ciência e Tecnologia e, desta forma, coordenar a massa crítica de pesquisadores nesse campo e continuar a fomentar pesquisas na área de doenças negligenciadas ⁴⁸.

Em 2006, foi iniciado no Brasil, o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas. O Programa foi objeto de um edital, que financiou 82 projetos relacionados a diferentes doenças negligenciadas, com um investimento total de R\$ 22,3 milhões. A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde é também parceira do Programa, contribuindo tecnicamente para o processo de definição de prioridades na área e para a avaliação dos resultados das pesquisas financiadas ⁴⁹.

Um estudo recente sobre o financiamento global de inovação para doenças negligenciadas revelou que menos de 5% do financiamento mundial de P&D para essas doenças foram investidos nas doenças extremamente negligenciadas, tais como doença de Chagas ⁵⁰.

Entre 2004 e 2007, 28 pesquisas sobre doença de Chagas foram financiadas, envolvendo investimentos da ordem de R\$ 8 milhões. Desse total, 75,5% dos recursos foram provenientes do Decit e 24,5% de parceiros como as fundações de amparo à pesquisa. Grupos de pesquisa de todas as regiões brasileiras foram contemplados, sendo que um pouco mais que a metade dos trabalhos foi de pesquisadores do Sudeste (53,6%) ⁴⁸.

Em novembro de 2008, foi realizado um encontro no Rio de Janeiro, que reuniu representantes de diversas instituições e países, para definir estratégia de pesquisa translacional em doenças negligenciadas, de forma a transformar resultados de pesquisas em aplicações médicas para atender à população brasileira. As discussões evidenciaram a necessidade de expandir o processo de desenvolvimento de tecnologias e medicamentos no país; de realizar parcerias entre institutos, empresas privadas e instituições de ensino; e de definir locais estratégicos para a realização de um programa em doenças negligenciadas,

como o Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), uma das obras do Programa de Aceleração de Crescimento (PAC), em processo de construção na Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. A partir do encontro, foi elaborado um documento, entregue ao Ministro da Saúde José Gomes Temporão, com vistas à criação efetiva do Programa Translacional do Brasil em Doenças Negligenciadas, para o qual está previsto o investimento de cerca de R\$ 500 mil em 2010 ⁴⁹.

Por meio de busca realizada na Pesquisa Saúde, Base de Dados Gerencial Decit do Ministério da Saúde (www.saude.gov.br/pesquisasaude), com as palavras-chave “doença de chagas” e “benznidazol” pode-se rastrear o número de projetos e o total de recursos financiados no período de 2002-2008 e 2005-2006, respectivamente (Tabela 1,2 e 3).

Com a análise da tabela 4, pode-se observar que a doença de chagas dentre as sete doenças extremamente negligenciadas com pesquisa subsidiada pelo governo é a que possui o maior número de publicações no intervalo de 2001 a 2008, sendo apenas alcançada atualmente pela Leishmaniose.

O número de patentes também pode ser utilizado como um indicador de conhecimentos e inovações geradas na área, contudo há uma grande discussão acerca da patenteabilidade de pesquisas com foco nas doenças negligenciadas, uma vez que a patente dificulta o acesso da população a uma alternativa de diagnóstico e/ou tratamento eficaz e de baixo custo, além de que estas patentes são muitas vezes frutos de projetos financiados pelo governo e ao público deveriam ser retornados os seus benefícios.

Por meio de uma busca realizada no *site* do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) (www.inpi.gov.br) com a palavra-chave “doença de Chagas” pode-se localizar 27 patentes depositadas de 1990 a 2007, abrangendo diagnóstico, tratamentos associados, formulações de fármacos com complexos de inclusão, técnica de extração e composição química de extratos com atividade aplicada ao tratamento das doenças de Chagas, dentre outros. Por meio de busca utilizando a palavra-chave “benznidazol” pode-se localizar uma patente depositada em 2007, que visa o processo de obtenção e uso de um composto transportador de BNZ, a base de rutênio ⁵².

A pesquisa em bases de dados internacionais de patentes não apresentou resultados enriquecedores ao assunto, esta afirmação pode ser justificada uma vez que o número de patentes está diretamente relacionado ao investimento financeiro realizado por instituições governamentais e/ou privadas e que a aplicabilidade comercial destes produtos é maior nos países acometidos por estas doenças.

Tabela 1. Resultado da Busca dos recursos investidos em “doença de Chagas”: 2002-2008.

Síntese da Busca				
Modalidade de Fomento	PPSUS (Edital)	Fomento Nacional (Edital)	Contratação Direta (Contrato)	Total (Editais + Contratos)
Nº de Editais/ Contratos	65	43	62	169
Nº de Projetos	1212	1202	91	2506
Nº de Recursos	R\$ 59.864.966,84	R\$ 298.185.015,28	R\$ 64.348.296,20	R\$ 422.398.278,32

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit. Base de Dados Gerencial. Capturado em 23/05/2009.

Tabela 2. Resultado da Busca dos recursos investidos em “benznidazol”: 2005-2006.

Síntese da Busca				
Modalidade de Fomento	PPSUS (Edital)	Fomento Nacional (Edital)	Contratação Direta (Contrato)	Total (Editais+Contratos)
Nº de Editais/ Contratos	1	2	1	4
Nº de Projetos	1	2	1	4
Nº de Recursos	R\$ 136.146,25	R\$ 491.500,00	R\$ 217.400,00	R\$ 845.046,25

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit. Base de Dados Gerencial. Capturado em 23/05/2009.

Tabela 3. Resultado da Busca dos projetos com “benznidazol”: 2005-2006.

UF	ANO	Edital / Contratação Direta	Título	Subagenda	Coordenador
DF	2005	Tratamento Multi-Fármaco da Doen...	Tratamento Multi-Fármaco da Doen...	Pesquisa Clínica	Antonio Teixeira
PE	2005	Assistência Farmacêutica	Desenvolvimento de formas farm...	Assistência Farmacêutica	Pedro José Rolim Neto
MG	2006	Programa Pesquisa para o SUS M...	Clínica, epidemiologia e terap...	Doenças Transmissíveis	Marta de Lana
RJ	2006	Doenças Negligenciadas	Inovação em medicamentos e ter...	Doenças Transmissíveis	Solange Lisboa de Castro

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit. Base de Dados Gerencial. Capturado em 23/05/2009

Tabela 4. Publicações por autores brasileiros nas sete doenças do programa de P&D em doenças negligenciadas.

Ano	Dengue	Hanseníase	Malária	Tuberculose	Esquist.	Leishm.	Chagas	Totais
2001	10	24	36	23	54	75	93	315
2002	10	17	28	26	72	97	103	353
2003	16	22	30	36	42	89	135	370
2004	15	23	35	42	66	87	125	393
2005	20	23	42	52	57	120	144	458
2006	26	21	50	59	100	136	157	549
2007	43	45	64	67	52	171	165	607
2008	68	62	83	141	61	214	236	865
Totais	208	237	368	446	504	989	1158	3910

Esquist. = Esquistossomose. Leishm. = Leishmaniose. Fonte: FIOCRUZ, 2009c.

CONCLUSÃO

A busca por alternativas ao combate à doença de Chagas é secular, por isso é imprescindível a intervenção do governo no fomento e na gestão em P&D de novos medicamentos eficazes e seguros para essa doença que atinge ou ameaça milhões de pessoas na América Latina. Uma vez que a pesquisa em doenças negligenciadas é apoiada, espera-se em contra partida que conhecimentos sejam gerados sobre os temas de pesquisa, e mensurados por indicadores de publicações científicas.

Na última década, observou-se uma coordenação mais efetiva dos esforços para potencializar os conhecimentos gerados com as pesquisas nos diferentes campos da ciência, endossada pelo papel do estado como provedor e maior financiador de saúde pública. Diversos agentes estão envolvidos nessas buscas, constituindo assim, um horizonte promissor no combate à doença que completa cem anos de sua descoberta.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SOARES-SOBRINHO, J.L. & et al. Desenvolvimento e validação do método analítico para o doseamento de benznidazol. *Rev. Bras. Farm.*, 87 (3):78-80, 2006.
2. WHO (World Health Organization). *TDR and product/drug discovery, introduction*, 2009. Disponível em: < <http://apps.who.int/tdr/svc/topics/product-drug-development> >, Acesso em: 13 de maio de 2009.
3. SILVA, A. L. M. & et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para a doença de chagas. *Quim. Nova*. 30 (5): 1163-1166, 2007.
4. MORAN, M. & et al. Neglected Disease Research and Development: How Much Are We Really Spending? *PLoS Medic.* 6 (2), 2009.
5. BESTETTI, R.B.; MARTINS, C.A. & CARDINALLI-NETO, A. Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879–1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Int. J. Cardiol.* 134: 9–16, 2009.
6. LEONARDI, D. & et al. Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. *Int. J. Pharm.* 367:140–147, 2009.
7. MARCILI, A. & et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* 39:615–623, 2009.
8. ALP, M. & et al. Synthesis and antiparasitic and antifungal evaluation of 20-arylsubstituted-1H,10H-[2,5]bisbenzimidazolyl-5-carboxamidines. *Eur. J. Med. Chem.* 44 : 2002–2008, 2009.
9. SENIOR, K. Chagas disease: moving towards global elimination. *Lancet infect. Dis.* 7 : 572, 2007.
10. DEVELOUX, M. & et al. Maladie de Chagas. Chagas disease. *La Rev med int*, 30 (8): 686-695, 2009.
11. ABAD-FRANCH, F. & et al. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 110: 159–177, 2009.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

12. FALLA, A. & et al. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 110 :15–21, 2009.
13. SOARES-SOBRINHO, J, L. *Sistema de vetorização de fármaco para comprimido de liberação clássica e prolongada a base de benznidazol*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, 2007a.
14. GUHL, F. Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 (1): 29–38, 2007.
15. PONCE, C. Current situation of Chagas disease in Central America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102 (1): 41–44, 2007.
16. MUÑOZ, J. & et al. Gascon (2009). Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: Immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop.* 111 (1): 51-55, 2009.
17. BRUTUS, L. & et al. Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101:1159–60, 2007.
18. FLORES-CHAVEZ, M. & et al. Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis.* 46: 44–47, 2008.
19. FORÉS, R. & et al. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 39: 127–128, 2007.
20. Lescure, F.X. & et al. Chagas disease. *France Emerg Infect Dis.* 14: 644–646, 2008.
21. DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). *Doenças Negligenciadas*, 2009a. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx >. Acesso em 02 de maio de 2009.
22. DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). *Quem faz parte da DNDi*, 2009b. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/sobre_dndi.aspx >. Acesso em: 04 de maio de 2009.
23. OLIVEIRA, M. F. & et al.. Tratamento etiológico da doença de chagas no Brasil. *Rev. Patol. Trop.* 37 (3): 209-228, 2008.
24. PAULA, F.R. & et al. Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. *Bioorgan. Med. Chem.* 17:2673–2679, 2009.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

25. Mezenzev, R. & et al. *Trypanosoma cruzi*: Antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 122: 66–69, 2008.
26. LAFEPE (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco). *LAFEPE conquista classificação da Organização Mundial de Saúde*, 2009. Disponível em: < <http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/noticias/noticiario/190808.html> >. Acessado em 13 de maio de 2009.
27. MSF (Médicos Sem Fronteiras). *MSF e DNDi lançam apelo para aumentar a pesquisa e desenvolvimento (P&D) na luta contra as doenças negligenciadas*, 2009. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/texto_noticias.aspx?id=79 >. Acesso em: 02 de maio de 2009.
28. BOURGUIGNON, S.C. & et al. *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* activity of Epoxy-alpha-Lap, a derivative of alpha-lapachone, on trypomastigote and amastigote forms. *Exp. Parasitol.* 122 (2): 91-96, 2009.
29. IZUMI, E. & et al. *Trypanosoma cruzi*: antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Exp. Parasitol.* 118 : 324–330, 2008.
30. FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). *A história da terapêutica da doença de Chagas* 2009a. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126> >. Acesso em 13 de maio de 2009.
31. VALDEZ, R.H. & et al. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 110 : 7–14, 2009.
32. VERZA, M. & et al. Biotransformation of a Tetrahydrofuran Lignan by the Endophytic Fungus *Phomopsis* Sp. *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (1): 195-200, 2009.
33. SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. & FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17 (3): 455-465, 2007.
34. RIBEIRO, C.M.R. & et al. Ciclização do lapachol induzida por sais de tálio III. *Quim. Nova.* 31 (4): 759-762, 2008.
35. ALVES, G.M.C. *Desenvolvimento de cápsula gelatinosa mole de β -Lapachona para terapias antineoplásicas em humanos*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

36. PALMA, A. & et al. Synthesis and in vitro activity of new tetrahydronaphtho[1,2-b]azepine derivatives against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19:2360–2363, 2009.
37. PIZZOLATTI, M.G. & et al. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). *Rev. Bras. Farm.* 18 (2): 177-182, 2008.
38. LEITE, A. C. L. & et al. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* 14 (11): 3749-3757, 2009.
39. SOEIRO, M.N.C. & CASTRO, S.L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert. Opin. Ther. Tar.* 13: 105-121, 2008.
40. DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). *Projetos da DNDi – Principais Atividades 2008/2009 – Doença de Chagas*, 2008. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/atuais_projetos_portfolio_dndi.aspx#Chagas>. Acesso em 25 de abril de 2009.
41. FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). *A história da terapêutica da doença de Chagas*, 2009b. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>>. Acesso em 13 de maio de 2009.
42. HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E. & et al. Synthesis and in vitro trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of N-acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1H-imidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (7): 2975-2984, 2009.
43. GUEDES, F. L. & et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. *Rev. Bras. Farm.* 89 (3): 220-225, 2008.
44. LIMA, A.A.N. *Desenvolvimento de dispersões sólidas e complexos de inclusão para benznidazol em formas farmacêuticas sólidas*, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco.
45. LAMAS, M.C. & et al. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *Int. J. Pharm.* 307 (2): 239-243, 2006.
46. DONNICIA, C. L. & et al. Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: Synthesis, biological characterization and structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (14): 5038-5043, 2009.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

47. Soares-Sobrinho, J, L. & et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de chagas. *Rev. Patol. Trop.* 36 (2): 103-118, 2007b.
48. BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit. Boletim Informativo Decit. Edição Especial: Oficina de Prioridades de Pesquisa em Saúde, julho, 2008.
49. BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit. Boletim Informativo Decit. Edição Especial, nº02, abril, 2009.
50. MSF (médicos sem fronteiras). *MSF atende a pacientes com chagas desde 1999*. Disponível em: < www.msf.org.br > Acesso em: 15 de março de 2009.
51. FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), 2009c. Disponível em: < www.fiocruz.br >. Acesso em 23 de maio de 2009.
52. INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual). www.inpi.gov.br. Acesso em: 23/05/2009 as 12:20h.

3.2 Artigo II. Ferramentas Analíticas Aplicadas à Caracterização de Complexos de Inclusão Fármaco-Ciclodextrina

Analytical Tools Applied To The Characterization Of Inclusion Complexes Drug – Cyclodextrin

Magaly Andreza Marques de Lyra¹, Lariza Darlene Santos Alves¹, Danilo Augusto Ferreira Fontes¹, José Lamartine Soares Sobrinho² & Pedro José Rolim Neto¹

¹ Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM- UFPE

² Núcleo de Tecnologia Farmacêutica – NTF – Universidade Federal do Piauí - UFPI

RESUMO

As ciclodextrinas (CDs) têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, a qual promove incremento na solubilidade de fármacos poucos solúveis. Variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser identificadas através de metodologias analíticas, que permitem detectar a formação dos complexos. O objetivo deste trabalho foi discutir os principais métodos utilizados na caracterização de CI com base numa uma revisão da literatura. Entre as diversas técnicas para caracterizar CI com CDs, nos estados líquido e sólido, tem-se a espectroscopia de absorção visível e ultravioleta (UV-Vis), técnica de fluorescência, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de H¹ e C¹³, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cristalográficas de raio-X, estudos térmicos, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FI-RT), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de Raman, calorimetria de titulação isotérmica (CTI), ensaios de dissolução, dentre outras.

PALAVRAS CHAVE: espectroscopia, complexo de inclusão, ciclodextrinas, métodos analíticos.

ABSTRACT

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

The cyclodextrins (CDs) have been used in pharmaceutical products development, due to your properties of complexation, mainly for the increase the solubility of low soluble molecules. The environment lipophilic of the inside cavity of the CDs its propitiates favorable conditions for the formation of inclusion complexes (IC) with hydrophobics compounds. Variations in the physical-chemical properties of the molecules guests are identificaded using analytic methodologies that allow to detect the formation of the complexes. The aim of this work was to discuss a literature review, the main methods used in the characterization of IC. There are several techniques to characterize the IC with CDs, in liquid and solid states, such as spectroscopy of visible and ultraviolet (UV) absorption, fluorescence technique, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) H^1 and C^{13} , high performance liquid chromatography (HPLC), X-ray crystallographic, thermal studies, infrared spectroscopy with the Fourier transform (FIRT), scanning electron microscopy (SEM), Raman spectroscopy, isothermal titration calorimetry (ITC) and studies of dissolution.

KEYWORDS: spectroscopy, inclusion of complex, cyclodextrins, analytics methods

INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, os quais proporcionam incremento de solubilidade e conseqüente aumento da taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, estabilidade, redução de irritações (gástrica, dérmica ou ocular) e diminuição ou eliminação de odores ou sabores desagradáveis, principalmente em formulações líquidas (GUEDES et al., 2008).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4, oligossacarídeos originados da degradação do amido pelas enzimas glicosiltransferases, sintetizadas por alguns microrganismos (JUN et al., 2007). As que são obtidas com maior rendimento são comumente conhecidas como CDs naturais e

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

contém seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD) respectivamente (CANNAVÀ et al., 2008). Nessas moléculas, os grupos hidroxilas primários e secundários estão orientados para o exterior do anel formado, na porção estreita e larga respectivamente, conferindo-lhe um exterior bastante hidrofílico e uma cavidade hidrofóbica, onde as moléculas hóspedes ou parte delas são encapsuladas (SÁ-BARRETO & CUNHA-FILHO, 2008).

A principal força motriz que favorece a encapsulação molecular consiste na substituição das moléculas de água (que possuem elevada entalpia) por moléculas hóspedes mais adequadas. Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado. Interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos CI (GÓRNAS et al., 2009).

Fármacos poucos solúveis freqüentemente apresentam comportamento de biodisponibilidade *in vivo* inferior quando comparados aqueles de alta solubilidade. Logo, a formação de CIs está dentre as alternativas mais vantajosas e eficientes quando se busca melhoria nas propriedades de dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco hidrossolúveis (SPRICIGO et al., 2008; LIMA et al., 2008).

Apesar do número crescente de trabalhos utilizando CDs na formação de complexos de inclusão (CIs), a abordagem sobre as técnicas de caracterização continua sendo de grande interesse no âmbito analítico. As propriedades físico-químicas dos fármacos e das CDs são relativamente diferentes daquelas apresentadas quando estão complexados. Partindo deste conceito, qualquer metodologia que tenha sensibilidade suficiente para medir estas diferenças pode ser utilizada para caracterizar estes complexos sob diferentes pontos de vista, permitindo direcionar os fenômenos de inclusão de acordo com as necessidades (BRITTO et al., 2004; CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi discutir os principais métodos utilizados para caracterização de CI de fármacos com CDs com base numa de uma revisão da literatura.

MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Uma das principais características das CDs é o fato de formarem CIs em solução, e no estado sólido. As fracas interações que ocorrem entre a molécula complexada e a CDs, característica intrínseca do sistema molecular, dificultam a utilização de algumas técnicas analíticas aplicadas à solução. Por outro lado, a caracterização de CIs no estado sólido é considerada de grande interesse devido às possibilidades de patentes (BRITTO et al., 2004).

Variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser identificadas através de metodologias analíticas, que permitam detectar a formação dos complexos (UEKAMA et al., 1998). A maioria dos estudos de caracterização de CIs com CDs em solução são por espectroscopia de absorção UV-Vis, técnica de fluorescência e espectroscopia de RMN H^1 e C^{13} (FRANCO et al., 2009; MILLER, CARRIER & AHMED, 2007).

Para os estudos que envolvem complexos em fase sólida, são utilizadas com mais frequência as técnicas de difração de raios-x, estudos térmicos, espectroscopia de FI-RT e estudos de dissolução (CANNAVÀ et al, 2008; LU et al, 2009). Existem relatos de outras técnicas de caracterizações que estão sendo recentemente utilizada, como a espectroscopia de Raman, eletroforese capilar, potenciometria, ITC, dicroísmo circular, entre outros (VENTURINE et al., 2008).

Caracterização da formação de complexos em estado líquido

Diagrama de solubilidade de fase

A abordagem mais utilizada para o estudo de complexação é o método descrito por Higuchi e Connors (1965), sendo considerada a primeira verificação de CIs em solução.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Esse estudo analisa os efeitos da adição do agente complexante sobre o composto a ser solubilizado permitindo obter a constante de complexação (K_c) e a estequiometria de formação do complexo, a partir da solubilidade intrínseca do substrato (S_0) e a inclinação da reta resultante do diagrama de solubilidade (Equação 1).

$$K_{1:1} = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{Inclinação})} \quad \text{Eq. 1}$$

Através da análise do diagrama de solubilidade obtido com o experimento (Figura 1), pode-se classificar os complexos de inclusão formados como perfis do tipo A e B. O tipo classificado como tipo A quando a solubilidade do substrato aumenta com o incremento da concentração de CD. Perfis do tipo B são obtidos com a formação de complexos de baixa solubilidade aquosa, em alguns casos, inclusive inferior à da molécula hospedeira e que precipitam à medida que há encapsulação.

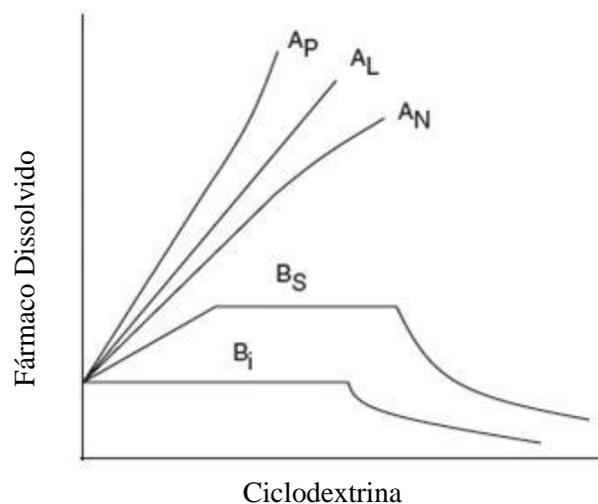


Figura 1. Diagrama de Solubilidade para avaliação dos complexos de inclusão.

Para muitos dos complexos formados, as constantes de estabilidade variam de 0 a 10^5 M^{-1} , demonstrando que mesmo com a formação de complexos estáveis, uma diluição de

1:100, diminui a porcentagem de complexação de 100% para 30%, o que possibilita a liberação do fármaco complexado nas membranas biológicas. Contudo, os efeitos da diluição devem ser bem elucidados na utilização desses complexos em formas farmacêuticas, devido às possibilidades de precipitação do fármaco quando existe uma relação de não-linearidade da solubilidade entre o fármaco e a CD (STELLA & RAJEWSKI, 1997; CHALLA et al., 2005).

As principais constantes publicadas de 123, 490, e 525 M⁻¹ para α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente, foram baseadas em estudos estatísticos. Valores baixos para a constante sugerem fraca afinidade do fármaco com as CDs, enquanto valores elevados indicam que o fármaco está fortemente ligado, o que pode reduzir consideravelmente a sua biodisponibilidade (MILLER, CARRIER & AHMED, 2007).

Szejtli (1994), na obtenção de diversos complexos de inclusão, sugeriu o valor de $K_c > 10^3 \text{ M}^{-1}$, verificando uma redução significativa da biodisponibilidade, devido a não-dissociação dos complexos. A situação desejada é ter a afinidade suficiente, tanto para ter a total concentração de fármaco complexado, como também para permitir a dissociação dos complexos para a sua absorção. Assim, deve-se investigar o uso de diferentes CDs ou diferentes tecnologias para caracterizar a formação de complexos de inclusão (MILLER, CARRIER & AHMED, 2007).

Outros parâmetros tais como os termodinâmicos, isto é, mudanças na energia livre de Gibbs (ΔG), na entalpia (ΔH) e na entropia (ΔS), podem ser obtidos em função da temperatura e da constante de estabilidade dos CIs (MARCELO et al., 2008). A ΔH pode ser determinada utilizando-se a equação de Van't Hoff (GRILLO et al., 2008a):

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \Delta H \frac{T_2 - T_1}{RT_2 - T_1} \quad \text{Eq. 2}$$

Para as mudanças de ΔG e de ΔS utilizam-se as equações 3 e 4, respectivamente (JUN et al., 2007) :

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{Eq. 3}$$

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad \text{Eq. 4}$$

A partir da obtenção do valor de ΔG é possível demonstrar a espontaneidade da reação, sendo possível avaliar se esta é favorável para a solubilização aquosa do fármaco. Em geral, a formação do CI está associada a valores de $\Delta G < 0$, proporcionais ao aumento de temperatura (T) e a concentração do agente solubilizante, devendo também ser considerada a natureza química da molécula hóspede na previsão da complexação. Nesse caso, também pode ser analisado qual complexante causa o melhor incremento na solubilidade aquosa, pois quanto maior a contribuição para o valor negativo de ΔG , melhor o efeito solubilizante (PATEL et al., 2008).

Uma série de moléculas apresenta correlações lineares entre a ΔH e ΔS , com valores crescentes e menos negativos, respectivamente. A α -CD hidratada, por exemplo, possui ligação de hidrogênio associada a uma molécula de água, e quando esta é eliminada, promove a redução significativa da tensão estérica na cavidade da CD diminuindo a entalpia do sistema. No caso da β -CD, um complexo estável apresenta uma ΔH negativa e uma ΔS próxima de zero (VALLE, 2004).

Jun et al. (2007) realizaram o diagrama de solubilidade de fases da sinvastatina na presença de concentrações crescentes de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e em diversas temperaturas, obtendo valores crescentes das constantes de complexação, o que é justificado pela provável redução das interações de Van der Waals e das forças hidrofóbicas, com a elevação da temperatura. Essas mudanças nos parâmetros termodinâmicos demonstram a espontaneidade da complexação.

Apesar de favorecer a complexação, o aumento da temperatura também pode desestabilizar o complexo. A estabilidade térmica, em geral, varia de acordo com a molécula hóspede e a ciclodextrina, mas variações de temperatura entre 50-60 °C podem acarretar em decomposição de alguns complexos (VALLE, 2004).

Espectroscopia de ultravioleta visível

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

A espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível (UV/VIS) é um método analítico baseado na propriedade das espécies iônicas ou moleculares absorverem determinados comprimentos de onda da radiação UV/VIS. No processo de absorção da radiação, a energia dos fótons é transferida para as moléculas do meio em análise para provocar transições eletrônicas associadas a transições vibracionais e rotacionais (LEAL et al., 2008).

As mudanças que ocorrem no espectro de UV, devido a formação do complexo, são geralmente identificadas pelos deslocamentos batocrômicos e/ou alargamento de bandas. O deslocamento no máximo de absorção de UV, pelo efeito da formação do complexo, pode ser explicado através da proteção parcial dos elétrons excitáveis e cromóforos presentes na cavidade das CDs (BUDAL, 2003).

Tendo em vista que os níveis energéticos das moléculas são quantizados, a absorção de energia pode ser considerada como um processo específico relacionado com a estrutura da espécie absorvente, a qual determina a energia envolvida na transição, e com a probabilidade de que esta ocorra. A intensidade da radiação que incide na amostra pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente (ROCHA & TEIXEIRA, 2004).

O ponto de intersecção de um grupo de espectros sobrepostos expressos em função da concentração evidencia a presença de uma mistura de dois estados e é denominado ponto isobéstico. Em relação à espectroscopia de UV-Vis, a presença de um ponto isobéstico pode ser considerada uma forte evidência para a formação de um complexo de inclusão. Por outro lado, a inexistência de ponto isobéstico não significa a ausência de CIs, uma vez que estes constituem somente uma parte da evidência em estudos de sistemas envolvendo complexos, a qual é tão importante quanto outras provas consistentes (VENTURINE et al., 2008).

Zhang et al. (2009) verificaram a formação do CI do ácido caféico com a HP- β -CD em solução através dessa técnica, onde foi observado um incremento na absorção nos

comprimentos de onda entre 283 e 309 nm com o aumento da concentração da HP- β -CD que variou de $0-6,0 \times 10^{-3}$ M.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais utilizadas na investigação da estabilidade, estequiometria, energia do processo de complexação e geometria dos CI em solução e no estado sólido (BOUQUET et al, 2007), principalmente quando existem resultados contraditórios obtidos por outras técnicas. Esta técnica permite visualizar de forma direta as interações que ocorrem entre as moléculas hóspedes e as CDs, sendo capaz de diferenciar qual parte da estrutura química do fármaco está sendo complexada (VEIGA et al., 2006).

Estas informações podem ser obtidas usando-se a espectroscopia monodimensional (RMN H^1), e são baseadas nas alterações de deslocamento químico, quando ocorre a formação dos CIs. É considerada a metodologia mais importante e rigorosa para a comprovação da formação de complexos em solução, devido a sensibilidade para detectar os fenômenos de complexação (FIGUEIRAS et al., 2007a).

A modificação nos sinais das CDs observado nesta técnica é consequência direta das alterações causadas pela associação com o fármaco, que pode alterar o microambiente ao redor dos átomos de hidrogênio no interior da cavidade. Da mesma forma, o fármaco incluído mostra alterações na leitura dos sinais correspondentes aos átomos que penetraram nas cavidades das CDs, que constituem um microambiente diferente daquele em que estava originalmente solvatado (VENTURINE et al., 2008).

O RMN- H^1 detecta durante a complexação o deslocamento químico para valores de campo mais altos para os H-3 e H-5 localizados no interior da cavidade, enquanto que os hidrogênios da superfície externa das CDs (H-1, H-2, H-4 e H-6) não são afetados ou mostram desvios mínimos (VEIGA et al., 2006).

As técnicas bidimensionais avançadas, tais como ROESY, revelam imagens detalhadas da geometria do CI em solução, permitindo o detalhamento estrutural de

estruturas complexas contendo CDs modificadas com variável grau de substituição (VEIGA et al., 2006).

Spamer et al. (2002) confirmaram a capacidade de complexação dos compostos furosemida/ β -CD pela técnica bidimensional ROESY, a qual demonstrou que o anel furano da molécula de furosemida acomoda-se por completo na cavidade da β -CD.

Técnica de Job

A técnica de variação contínua *Job plot* baseia-se na variação de um parâmetro físico-químico observado na presença de CDs e que pode ser medido por técnicas espectroscópicas, como RMN ou fluorescência (SHAFI & SHIHRY, 2009; GRILLO et al., 2008b). Este método é válido para qualquer técnica experimental que mede uma magnitude diretamente proporcional à concentração do complexo formado. Baseia-se no fato de que qualquer função que dependa diretamente da concentração do complexo, apresenta um máximo referente à fração molar de um dos componentes que formam o complexo. Em função deste máximo pode-se obter o coeficiente estequiométrico da complexação (DUBAL, 2003).

Devido a habilidade das CDs de formarem complexos com uma grande variedade de compostos em solução, algumas alterações nas propriedades físicas, químicas ou biológicas das moléculas hóspedes podem ocorrer (GÓRNAS et al., 2009).

Misiuk & Zalewska (2009) utilizaram esta técnica para determinar a estequiometria do complexo de trazodona com o HP- β CD. Esta técnica também foi utilizada na determinação da estequiometria de CIs envolvendo a β -CD (FRACETO et al., 2007).

Modelagem Molecular

As estruturas moleculares formadas pelos fármacos e CDs podem ser simuladas utilizando programas computacionais. No estudo de modelagem molecular é analisa-se

como se procede a formação dos CIs e as orientações dos fármacos nas cavidades das CDs (ARAÚJO et al., 2009).

Estruturas moleculares com energia conformacional mínima podem ser dimensionadas com métodos funcionais da teoria da densidade (DFT) e métodos semi-empíricos, e os cálculos do estado de excitação eletrônica podem ser executados empregando programas específicos (ARAÚJO et al., 2009; AALTONEN et al., 2008). Como exemplo de métodos semi-empíricos, o AM1, PM3 e PM6 têm sido bastante utilizados para simular geometrias de CDs e dos prováveis complexos em solução e a vácuo (BRITO et al., 2004).

A predição computacional de espectros vibracionais, também pode ser usada para compreender melhor a estrutura intra e intermolecular, incluindo a conformação molecular, e a ligação intermolecular nos sólidos e soluções (AALTONEN et al., 2008). Nos estudos computacionais de Vueba et al. (2006), foram previstos os espectros do cetoprofeno nas duas conformações da menor energia, e na comprovação dos espectros com aqueles experimentais, verificou-se apenas uma conformação de baixa energia, tanto no estado líquido como no sólido.

Rossi et al. (2006) estudaram a estrutura do CI indometacina-CDs utilizando o método de simulação vibracional molecular. Verificaram que em solução, uma parte da molécula (cloro-benzeno) da indometacina é inserida na CDs pela cavidade maior e a amida é afetada pelo processo de inclusão (AALTONEN, 2008).

Determinação por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência

A caracterização dos CIs formados entre a molécula hóspede e as CDs pode ser realizada através do estudo por CLAE, utilizando CDs-sílica na fase estacionária, o mais raro por não suportarem altas pressões do equipamento, ou CDs, principalmente as modificadas altamente solúveis, na fase móvel do sistema de CLAE em fase reversa. As CDs nas fases móveis também foram usadas com sucesso para as separações de enantiômeros de vários compostos quirais, que incluem barbitúricos, mefenitoína, ácido

mandélico e seus derivados, fenilalanina, talidomida e pseudoefedrina (BOSCH et al., 2008; LI & PURDY, 1992).

As CDs são adicionadas na fase móvel e a retenção do soluto estará condicionada pela partição do fármaco entre a fase móvel e estacionária, e a complexação do soluto com as CDs. O tempo de retenção diminui à medida que aumenta a concentração de CDs na fase móvel, devido à provável formação do complexo fármaco-CD, o que melhora a solubilidade do soluto na fase móvel, reduzindo o tempo de retenção na coluna (MELO et al., 2008).

De acordo com o tempo de retenção do soluto e o volume morto da coluna os fatores de capacidade são calculados para cada fármaco na presença de concentrações crescentes de CD. Na presença desta, leva a uma contribuição adicional no comportamento da retenção do fármaco devido ao processo de complexação (GRILLO et al., 2008b).

Caracterização da formação de complexos em estado sólido

Métodos Térmicos

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização das CDs e dos seus complexos, principalmente pela rapidez das análises. Dentre os mais utilizados, temos a calorimetria exploratória diferencial (DSC), que permite a detecção quantitativa de todos os processos em que requer energia (FIGUEIRAS et al., 2007b).

É uma técnica bastante utilizada na prática farmacêutica, devido a sua habilidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância, mostrando-se como um instrumento analítico importante na caracterização de interações no estado sólido entre fármacos e CDs (ARAÚJO et al., 2009).

A formação do CI pode ser identificada nos perfis de DSC, pelo desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e variações relevantes na entalpia do fármaco puro e complexado (FIGUEIRAS et al., 2007a; RIBEIRO et al., 2008). Esta técnica é normalmente é suplementada com um método secundário (espectroscopia) para mostrar, por exemplo, que a perda de um pico de fusão é devido à formação de um CI em vez de degradação térmica ou uma perda de cristalinidade (MILLER, CARRIER & AHMED, 2007).

Bouquet et al. (2007) utilizaram a técnica de DSC para identificar complexos de paclitaxel e randomizada metilada- β -ciclodextrina (RM- β -CD), no qual verificou-se nos termogramas do complexo, o desaparecimento do pico de fusão endotérmico do fármaco, típico da possível formação de complexos, verificado também em outros trabalhos (BETTINETTI et al., 2002).

Também são citados alguns experimentos com o objetivo de verificar a recristalização após alguns dias da obtenção, que possam garantir a estabilidade dos produtos obtidos e a efetividade do incremento da solubilidade durante um intervalo de tempo (FRANCO et al., 2001).

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

As técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) são bastante utilizadas na caracterização de sistemas sólidos com CDs, por serem determinações rápidas e precisas, ainda que a informação conseguida por este ensaio apresente limitações. A débil natureza dos fenômenos envolvidos na complexação torna os desvios e mudanças de intensidade das bandas correspondentes aos grupos químicos do fármaco ou da CD bastante sutis, requerendo uma cuidadosa interpretação dos dados (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

A formação dos CI na fase sólida pode ser avaliada pela comparação de espectros de infravermelho do fármaco puro e dos complexos sólidos obtidos por diferentes métodos de preparação (SPRICIGO, 2008). Para isso, são verificadas interações a nível molecular,

detectando as mudanças significativas na forma e na posição das faixas de absorvância, através do espectro vibracional dos diferentes grupos funcionais das moléculas de fármacos complexados e livres.

Entre todas as técnicas, os métodos espectroscópicos oferecem algumas vantagens importantes na análise dos complexos, por ser não-destrutiva, permitir informações químicas, ser rápido e utilizar pequenas quantidades de material (microgramas) (CANNAVÀ et al., 2008; AALTONEN et al., 2008). Recentemente, Cupri et al. (2007) aplicaram esta técnica para caracterizar complexos de Genistéina com β -CDs em estado sólido.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas do conhecimento, sendo amplamente utilizado para estudar os aspectos estruturais dos materiais. O uso desta técnica vem se tornando mais freqüente por fornecer informações detalhadas, com aumentos de até 300.000 vezes, do estado de cristalização de produtos obtidos por diferentes técnicas de complexação e dispersão (DUARTE et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008).

O conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos. A partir do MEV, avalia-se a contribuição com relação à diminuição da cristalinidade das partículas obtidas através dos diversos métodos para a formação dos CI no estado sólido, à medida que permite a visualização e diferenciação das partículas de CD e dos cristais dos fármacos (PRALHAD & RAJENDRAKUMA, 2004).

Em geral, as partículas de CDs são globulares, medindo de 1 a 180 μ m, enquanto que os fármacos apresentam-se na forma de cristais menores, com formato irregular, mas com uma distribuição de tamanho de partícula mais homogênea (RIBEIRO et al., 2003). Nas misturas físicas é possível distinguir as partículas de fármaco das partículas de CDs.

Porém, quando um complexo é formado, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura da molécula hóspede com as CDs.

Apesar dos estudos de MEV serem inadequados para confirmar a formação de CI, as alterações drásticas na forma das partículas, bem como no seu aspecto e tamanho apontam para a existência de novas fases sólidas.

Recentemente, Soares-Sobrinho et al. (2008) verificaram que nos complexos de benznidazol com a randomizada metil- β -ciclodextrina (RM β CD) e Sulfa-butil-éter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) obtidos por misturas físicas (MF), malaxagem (MLX), liofilização (LIO) e co-evaporação (ECO), apresentaram mudanças no aspecto morfológico das partículas, tanto das CDs como do fármaco, assim observado nas fotomicrografias realizadas por MEV (Figura 2).

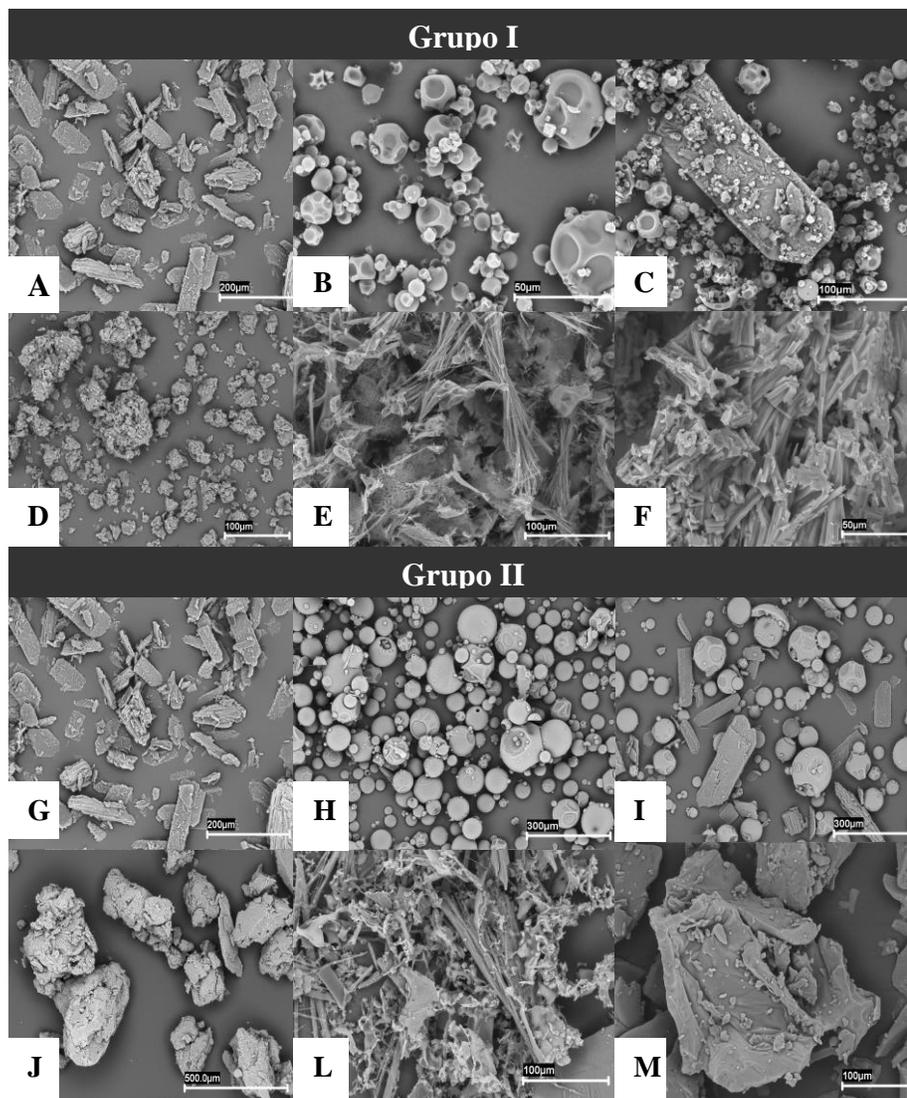


Figura 2. Fotografias da Microscopia Eletrônica de Varredura (**Grupo I**) microfotografia eletrônica de varredura do benznidazol (A), RM β CD (B), MF (C), MLX (D), LIO (E) e COE (F). (**Grupo II**) microfotografia eletrônica de varredura do benznidazol (G), SBE β CD (H), MF (I), MLX (J), LIO (L) COE (M).

Propriedades de Dissolução

A solubilidade de um fármaco constitui requisito prévio à absorção e obtenção de resposta clínica, para a maioria dos medicamentos administrados por via oral, neste

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

contexto, a complexação de fármacos com CD vem se mostrando uma técnica eficaz (RAMA et al., 2006).

Os efeitos da complexação sobre tais propriedades podem ser atribuídos a fatores como mudança no estado cristalino do fármaco, aumento da molhabilidade dos sólidos e da solubilidade aparente dos fármacos (SPRICIGO et al., 2008), justificando-se assim, a importância e necessidade dos estudos de dissolução.

Os dados de dissolução podem ser apresentados e tratados utilizando vários métodos de análise: perfis de dissolução, tempos de dissolução, fração de fármaco dissolvido num intervalo de tempo e eficiência de dissolução (RAMA et al., 2006), permitindo avaliar a contribuição no incremento da solubilidade do fármaco, e conseqüentemente sua biodisponibilidade e eficácia clínica *in vivo*.

Outros métodos aplicados à caracterização de complexos de inclusão

Calorimetria de Titulação isotérmica (CTI)

A titulação calorimétrica isotérmica é uma das mais importantes ferramentas utilizadas no estudo de processos de complexometria. Esta técnica utiliza como fundamento a medida direta do fluxo de calor envolvido em uma reação, geralmente resultante da quebra e formação de interações intermoleculares. Ela pode estimar parâmetros termodinâmicos do processo de complexação, como mudanças na Energia Livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS), determinando a estequiometria de ligação da interação entre duas ou mais moléculas em solução e a constante de formação de CI (SOUSA et al., 2008).

Espectroscopia Raman

A espectroscopia de Raman, durante as duas últimas décadas, tem sido uma ferramenta de pesquisa bastante usada na área farmacêutica. Embora haja uma abundância das publicações recentes que tratem das aplicações da espectroscopia de Raman, o número

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

de estudos quantitativos é ainda limitado. Diversos trabalhos demonstram o número de vantagens da técnica de Raman sobre a de infravermelho, principalmente por não haver interferência da água nos espectros. Mas também apresenta algumas desvantagens, como equipamento de alto custo e a complexidade dos lasers e dos sistemas de detectores (AALTONEN et al., 2008).

A técnica de Raman é uma espectroscopia molecular vibracional que deriva de um processo de espalhamento de luz. É principalmente aplicado para vibração simétrica, grupo não polar e banda homoatômica, tais como S=S, S-S, N=N, C=C e O=O. Enquanto a espectroscopia de infravermelho é aplicada para vibração assimétrica, grupo polar e banda heteroatômica, como C=O, O-H e H-Cl. Portanto, estes dois tipos de espectroscopia são complementares para caracterizar a formação de CI (LU et al, 2009).

CONCLUSÕES

Diante da vasta utilização de CDs na obtenção de CI com diferentes fármacos que possuem baixa solubilidade, métodos de caracterização estão sendo ampliados, possibilitando sua melhor compreensão e controle. Esta revisão mostra as diversas ferramentas analíticas existentes na atualidade para identificação de variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes nos CI, que vão desde técnicas simples de estudo de solubilidade até técnicas espectroscópicas mais complexas, fornecendo informações sobre o comportamento dos complexos, nos estados líquido e sólido, como também associados a sistemas multicomponentes.

REFERÊNCIAS

Aaltonen J, Gordon KC, Strachan CJ, Rades T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterize pharmaceutical solids. *Int J Pharm* 2008; 34: 159-169.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Araújo MVG, Macedo FLO, Nascimento CC, Conegero LS, Barreto LS, Almeida LE, Costa NB JR, Gimenez LF. Characterization, phase solubility and molecular modeling of β -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex. *Spectrochim Acta* 2009; 72: 165–170.

Bettinetti GP, Sorrenti M, Rossi S, Ferrari F, Mura P, Faucci MT. Assessment of solid-state interactions of naproxen with amorphous cyclodextrin derivatives by DSC. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30: 1173-1179.

Bosch ME, Sanchez AJR, Rojas FS, Ojeda CB Recent advances in analytical determination of thalidomide and its metabolites. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46 (1): 9-17.

Bouquet WI, Ceelen W, Fritzinger B, Pattyn P, Peeters M, Remon JP, Vervaet C. Paclitaxel/ β -cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion – Formulation and stability. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 66: 391–397.

Britto MAFO, Nascimento-JR CS, Santos HF. Análise Estrutural de Ciclodextrinas: Um Estudo Comparativo entre Métodos Teóricos Clássicos e Quânticos. *Quim Nova* 2004; 27 (6): 882-888.

Budal RM. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. [Dissertação] Florianópolis: Faculdade de química, UFSC; 2003.

Cannavà C, Crupi V, Ficarra P, Guardo M, Majolino D, Stancanelli R, Venuti V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV–vis and FTIR-ATR spectroscopies. *Vib Spectrosc* 2008; 48: 172–178.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Kharl, RK. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review, *AAPS Pharm Sci Tech* 2005; 6: 329–357.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Crupi V, Ficarra R, Guardo, M, Majolino D, Stancanelli R, Venuti V. UV–vis and FTIR–ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44: 110–117.

Cunha Filho MSS, Sá Barreto LCL. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007; 28 (1): 1-9.

Duarte LC, Juchem PL, Pulz G M, Brum TMM, Chodur N, Liccardo A, Fischer AC, Acauan RB. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. *Pesquisas em Geociências* 2003; 30 (2): 3-15.

Figueiras A, Carvalho RA, Ribeiro L, Torres-Labandeira JJ, Veiga FJB. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 2007a; 67: 531–539.

Figueiras A, Sarraguça JMG, Carvalho RA, Pais AACC, Veiga FJB. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of β -cyclodextrin: phase solubility, NMR spectroscopy and molecular simulation, *Pharm Res* 2007b; 24 (2): 377-389.

Fraceto LF, Gonçalves MM, Moraes CM, Araújo DR, Zanella L, Paula E, Pertinhez TA. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. *Quím Nova* 2007; 30 (5): 1203-1207.

Franco C, Schwingel L, Lula I, Sinisterra RD, Koester LS, Bassani VL. Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex Characterization. *Int J Pharm* 2009; 369: 5–11.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Franco M, Trapani G, Latrofa A, Tullio C, Provenzano MR, Serra M, Muggironi M, Biggio G, Liso G. Dissolution properties and anticonvulsant activity of phenytoin-polyethylene glycol 6000 and-polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. *Int J Pharm* 2001; 225: 63–73.

Górnas P, Neunert GZ, Ski KB, Polewski K. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chem* 2009; 114: 190–196.

Grillo R, Melo NFS, Moraes CM, Lima R, Menezes CMS, Ferreira EI, Rosa AH, Fraceto LF. Study of the interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal* 2008a; 47: 295-302.

Grillo R, Melo NFS, Fraceto LF, Brito CL, Trossini GHG, Menezes CMS, Ferreira EI, Moraes CM. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Quím Nova* 2008b; 31 (2): 290-295.

Guedes FL, Alves GMC, Santos FLA, Lima LF, Rolim LA, Rolim Neto PJ. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. *Rev Bras Farm* 2008; 89 (3): 220-225.

Higuchi T, Connors K. Phase-solubility techniques. *Advances in analytical chemistry and instrumentation. Wiley-Intersci* 1965; 117-212.

Jun SW, Min S, Kim MS, Kim JS, Park HJ, Lee S, Woo JS, Hwang JS. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 66: 413–421.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Leal AAX, Henriques CA, Luna AS. Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por Espectrofotometria Uv-Vis. *Rev Anal* 2008; 32: 28-34.

Li S, Purdy WC. Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry. *Chem Rev* 1992; 92: 1457-1470.

Lima AAN, Sobrinho JLS, Corrêa JR RAC, Rolim Neto PJ. Alternative Technologies to Improve Solubility of Poorly Water Soluble Drugs. *Lat Am J Pharm* 2008; 27 (5): 789-97.

Lu Y, Zhang X, Lai J, Yin Z, Wu W. Physical characterization of meloxicam- β -cyclodextrin inclusion complex pellets prepared by a fluid-bed coating method. *Particuology* 2009; 7: 1-8.

Marcelo G, Francisco R, Gonzalés-Álvarez MJ, Mendicuti F. Fluorescence properties of (R)- and (S)-[1,1-binaphthalene]-2,2-diols solutions and their complexes with cyclodextrins in aqueous medium. *J Photochem Photobiol A Chem* 2008; 200: 114-125.

Melo FSN, Grillo R, Rosa AH. Interaction between nitroheterocyclic compounds with β -cyclodextrins: Phase solubility and HPLC studies. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47: 865-869.

Miller LA, Carrier RL, Ahmed I. Practical Considerations in Development of Solid Dosage Forms that Contain Cyclodextrin. *J Pharm Sci* 2007; 96: 1691-1707.

Misiuk W, Zalewska M. Investigation of inclusion complex of trazodone hydrochloride with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Carbohydr Polym* 2009; 77 (3): 482-488.

Patel RP, Patel DJ, Bhimani DB, Patel JK. Physicochemical Characterization and Dissolution Study of Solid Dispersions of Furosemide with Polyethylene Glycol 6000 and Polyvinylpyrrolidone K30. *Dissolut Technol* 2008; 17-25.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Pralhad T, Rajendrakuma K. Study of freeze-dried quercetin-cycloextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffractions and SEM analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34: 333-339.

Rama ACR, Veiga F, Figueiredo IV, Sousa A, Caramona M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Rev Bras Cienc Farm* 2006; 42 (1): 59-68.

Ribeiro A, Figueiras A, Santos D, Veiga F. Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin. *AAPS Pharm Sci Tech* 2008; 9 (4): 1102-1109.

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 Biopharm* 2005; 24: 1–13.

Ribeiro L, Loftsson T, Ferreira D, Veiga F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether β - cyclodextrin binary and ternary complexes. *Chem Pharm Bull* 2003; 51: 914-922.

Rocha FRP, Teixeira LSG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Quím Nova* 2004; 27 (5): 807-812.

Rossi B, Verrocchio P, Viliani G, Scarduelli G, Guella G, Mancini I. Vibrational properties of inclusion complex: the case of indomethacin-cyclodextrin. *Journal Chem. Phys* 2006; 125 (4): 1-8.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Sá-Barreto LCL, Cunha-Filho MSS. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. *Lat Am J Pharm* 2008; 27 (4): 629-636.

Shafi AAA, Shihry SS. Fluorescence enhancement of 1-naphthol-5-sulfonate by forming inclusion complex with β -cyclodextrin in aqueous solution. *Spectrochim Acta* 2009; 72: 533-537.

Sousa FB, Denadai AML, Lula IS, Lopes JFH, Elio FSHF, Almeida WB, Sinisterra RB. Supramolecular complex of fluoxetine with β - cyclodextrin: An experimental and theoretical study. *Int J Pharm* 2008; 353: 160-169.

Soares-Sobrinho JL, Cunha-Filho MSS, Rolim-Neto PJ, Torres-Labandeira JJ, Dacunha-Marinho B. Benznidazole. *Acta Cryst* 2008; 64: 634.

Spamer E, Muller DG, Wessels PL, Venter JP. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 16: 247-253.

Spricigo R, Botelho KCA, Consiglieri VO, Serra CHR. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. *Lat Am J Pharm* 2008; 27 (5): 645-653.

Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res* 1997; 14: 556-567.

Szejtli J. Medicinal applications of cyclodextrins. *Med Res Rev* 1994; 14: 353-386.

Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem Rev* 1998; 98: 2045-2076.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* 2004; 39: 1033–1046.

Veiga FJB, Pecorelli CCMF, Ribeiro SSL. *As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica*. 1ª ed., editora Minerva Coimbra, 2006: 140-143.

Venturine CG, Nicoline J, Machado C, Machado VG. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim Nova* 2008; 31(2): 360-368.

Vueba ML, Pina ME, Veiga F, Sousa JJ, Batista CLAE. Conformational study of ketoprofen by combined DFT calculations and Raman spectroscopy. *Int J Pharm* 2006; 307: 56–65.

Zhang M, Li J, Zhang L, Chao J. Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl-cyclodextrin. *Spectrochim Acta* 2009; 71: 1891–1895.

Capítulo II

4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA PRIMA BENZNIDAZOL

4.1 Artigo III - Caracterização Físico-química do Tripanomicida Benznidazol para o Desenvolvimento de Medicamentos

Artigo aceito: Latin American Journal of Pharmacy

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

4.1 Artigo III - Caracterização Físico-Química do Tripanomicida Benznidazol para o Desenvolvimento de Medicamentos

Physico-chemical characterization of benznidazole tripanomicida for medicines development

Magaly Andreza Marques de Lyra¹, Lariza Darlene Santos Alves¹, José Lamartine Soares Sobrinho² & Pedro José Rolim Neto¹

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM – UFPE

²Núcleo de Tecnologia Farmacêutica – NTF – Universidade Federal do Piauí - UFPI

RESUMO

Este trabalho objetivou a caracterização físico-química do benznidazol (BNZ), utilizando diversas técnicas. Os dados obtidos nos espectrogramas de infravermelho mostraram as principais características da carbonila e deformação N-H; as vibrações devido ao grupo benzílico e imidazólico. O BNZ apresentou pico endotérmico em aproximadamente 190°C referente a fusão. O perfil difractométrico revela a presença de picos de maior intensidade a 7,5; 16,5 e 22° 2 θ , evidenciando o comportamento cristalino do BNZ, colaborando com as micrografias obtidas. Obteve-se um percentual dissolvido de BNZ de aproximadamente 25% em 60 min. Os resultados permitiram a determinação detalhada das características do fármaco (classe II), passo relevante na produção de medicamentos.

PALAVRAS CHAVE: Caracterização, Doença de Chagas, Pré-formulação.

ABSTRATC

The aim of this work was the benznidazole (BNZ) physical-chemical characterization by diverse techniques. The infrared spectrum obtained show carbonyl stretch, N-H deformation and vibrations from benzyl and imidazole group. The BNZ show endothermic melting peak at 190°C. The diffractometry profile show two major peaks at 7.5, 16.5 and 22° 2 θ , showing the crystalline state of the drug, corroborating with the obtained micrographics. The dissolution rate of the drug is approximately 25% in 60 minutes. The

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

data obtained allowed an important step for medicines development, the drug characterization.

KEYWORDS: Chagas disease, Characterization, Pre-formulation.

INTRODUÇÃO

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos fármacos é um fator indispensável durante o desenvolvimento das formas farmacêuticas. Portanto, a caracterização do princípio ativo, deve ser o primeiro passo no planejamento, de modo que as informações obtidas possibilitem uma abordagem racional no desenvolvimento da formulação. Essa primeira fase é conhecida como *pré-formulação*^{1,2}.

Fatores como a presença de diferentes formas polimórficas, impurezas, tamanhos e formatos cristalinos na matéria-prima utilizada, devem possibilitar o controle adequado do material em questão. A mudança da forma cristalina pode acarretar alterações na temperatura de fusão, densidade, solubilidade, estabilidade física ou química, dissolução e biodisponibilidade de um fármaco e de sua formulação. A caracterização é realizada através de técnicas diversas tais como, análise térmica, determinações do tamanho da partícula e da área superficial, espectrométricas (UV e IV/RAMAN), difração de Raios-X, modelagem molecular, avaliação do perfil de dissolução, entre outros³.

Ao se tratar de fármacos de baixa solubilidade, a etapa de pré-formulação, torna-se ainda de maior relevância devido aos ensaios usualmente utilizados no controle de qualidade de matérias-primas, podendo não ser discriminativo, ocasionando desvios de qualidade antes (qualificação de fornecedores), durante (processo produtivo) e após (estabilidade de acompanhamento) a produção das formas farmacêuticas^{1,3}.

O benznidazol (BNZ) é classificado como classe II (reduzida solubilidade e alta permeabilidade) de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, sendo

fracamente solúvel em água e nos fluidos aquosos, sendo que sua absorção limitada pela velocidade de dissolução e solubilidade⁴.

Com o objetivo de alterar sua solubilidade, além de impedir a ocorrência de possíveis eventos, como por exemplo, a diminuição de solubilidade do ativo (ocorrência de polimorfos), várias técnicas vêm sendo aplicadas, dentre elas a de dispersão sólida, complexos de inclusão⁴.

Alguns estudos com o BNZ, um derivado nitroimidazol (Fig. 1), com diferentes abordagens como desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de teor^{5,6}, compatibilidade fármaco-excipientes⁷, forma farmacêutica⁸ e caracterização são relatados⁹, sendo este fármaco de extrema importância no tratamento da doença de Chagas, infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, por ser o único agente terapêutico disponível, especialmente efetivo na fase aguda de infecção¹⁰.

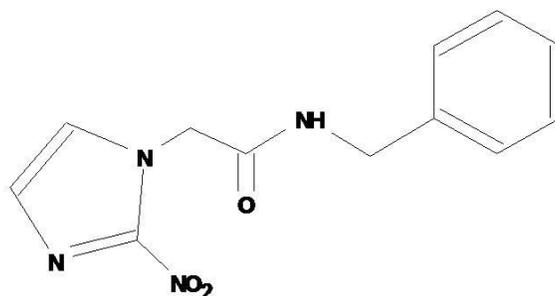


Figura 1: Estrutura química do BNZ

Durante a utilização destas técnicas, diversos estudos de caracterização com o fármaco isolado e associado a outras substâncias necessitam ser realizados, demonstrando a importância do conhecimento prévio das características físico-químicas do fármaco, possibilitando o controle adequado dos processos de produção, essencial para garantir qualidade do medicamento, assegurando sua eficiência e segurança.

Desvios nas características recomendadas podem significar riscos graves para a saúde dos pacientes. Um exemplo desta situação foi descrita quando a baixa qualidade de amostras de medicamentos contendo primaquina em um estudo de 12 amostras de 9

diferentes fabricantes foram reprovadas em ensaios quali-quantitativos descritos na Farmacopéia Americana¹¹.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização do BNZ, fornecendo conhecimentos básicos e complementares aos que já se encontram disponível na literatura, necessários ao desenvolvimento racional de formulações, através de diferentes técnicas, com a finalidade de produzir e controlar formas farmacêuticas estáveis e eficazes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O BNZ (N-benzil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida) foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Com pureza estimada, por meio de técnica de DSC e cromatografia líquida de alta eficiência, de 99,9%⁹.

Métodos de Caracterizações Físico-Químicas

Foram utilizadas as técnicas de difração de Raios-X (DR-X), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e dissolução.

Difração de Raios-X

Os resultados de difração de Raios-X de pó foram obtidos utilizando equipamento copper radiation (40 Kv, 30 mA), com o difratômetro Philips PW 1729 (Philips Corp, Holanda), geometria de Bragg-Brentano com intervalo de $2 < 2\theta < 60$, tamanho de fenda de $0,02^\circ$ e tempo de tomada de 2 segundos.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Amostras de peso entre 3 a 4 mg foram colocadas em porta amostra de alumínio e aquecida de 30°C a 250°C na razão de 10°C.min⁻¹ utilizando módulo de temperatura DSC Q100 calorímetro (TA Instruments, New Castle, DE). Foi utilizado Nitrogênio como gás de purga, com fluxo de 50 mL.min⁻¹. A calibração da temperatura e razão de aquecimento foi realizada com padrão de índio.

Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando equipamento Bruker IFS-66V spectrometer (Bruker Daltonics Inc, Bremen, Alemanha). As amostras foram misturadas com brometo de potássio e obtidas pastilhas.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Morfologia das superfícies das amostras foi examinada utilizando LEO- 435VP microscópio eletrônico de varredura (Leica Microsystems, Cambridge, RU). Partículas foram fixadas em suporte recobertas por ouro sob vácuo.

Estudos de Dissolução

Os estudos de dissolução foram realizados seguindo especificações do *Food and Drug Administration* (FDA) e *United State Pharmacopea* (USP) utilizando pá como aparato (Turu Grau DT-6, Barcelona, Espanha) a 75 rpm e 37°C (±0,5°C). O volume de 900 mL de ácido clorídrico mais cloreto de sódio, pH 1,2 foi utilizado como meio. Amostras do BNZ foram colocadas em cápsulas com 50 mg de BNZ com partícula de tamanho entre 50-200 µm. Os tempos de coleta foram de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos, onde após filtração determinou-se a concentração das amostras por espectrofotometria a 324 nm. Para

cada sistema obtido 3 replicatas foram testadas. O perfil de dissolução foi avaliados utilizando-se eficiência de dissolução nos intervalos de 15 e 20 minutos (DE15 e DE20)¹².

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Difração de Raios-X

Para a análise do difratograma do BNZ no estado sólido, o perfil difractométrico do fármaco revela a presença de 3 picos de maior intensidade a 7,5; 16,5 e 22 °2θ, além de diversos picos secundários, evidenciando o comportamento cristalino do BNZ, sugerindo que o fármaco analisado apresenta-se como um composto de características cristalinas.

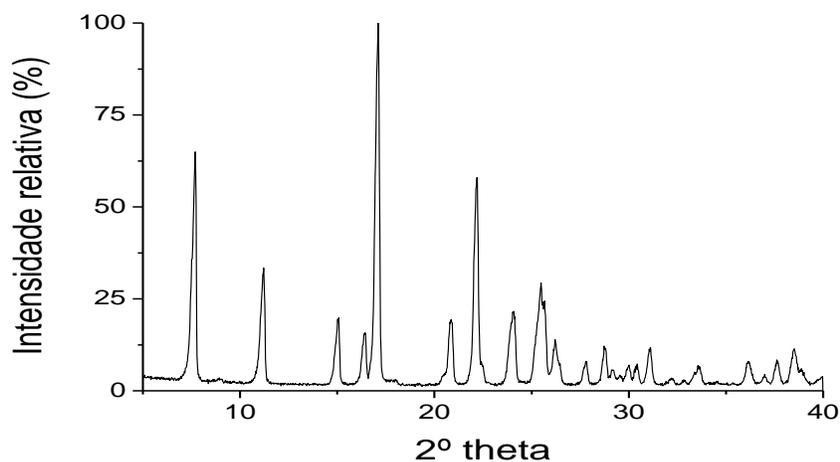


Figura 2: Difratograma de Raios-X do BNZ

Outra técnica cristalográfica mais sofisticada utilizada é o ensaio de difração de Raios-X de monocristal. Este, por sua vez, é o único capaz de estabelecer com precisão a estrutura geométrica do cristal¹⁵. A conformação cristalográfica do BNZ, realizado por Soares-Sobrinho⁹, descreve a orientação relativa dos três fragmentos planares, o grupo imidazol (A), grupo benzil (B) e fragmento acetamida (C), com seus correspondentes

ângulos diedro, sendo eles: A/C = 88,17; B/C = 67,12 e A/B = 21,05. Estes três fragmentos planares podem ser visualizados através da estrutura tridimensional na Figura 3.

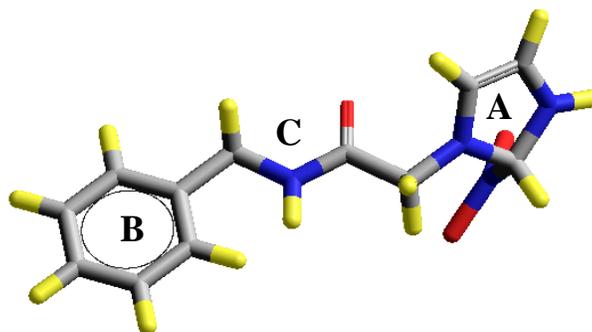


Figura 3: Estrutura molecular tridimensional do BNZ.

As limitações dessa técnica incluem a dificuldade de obtenção de um cristal isolado, com tamanho adequado ao ensaio, a complexa análise dos dados e os elevados custos envolvidos¹⁵.

Calorimetria Exploratória Diferencial

As técnicas de análise térmica apresentam aplicações em diversos ramos da ciência, entre eles a indústria farmacêutica, pelo fato de serem alternativas rápidas e seguras para caracterização e estudo das matérias-primas¹⁶.

O ponto de fusão do BNZ, preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV ed., apresenta-se como uma propriedade física que auxilia na sua identificação, análise de pureza e estabilidade; contudo, outras técnicas mais modernas e complexas vêm sendo utilizadas^{17,18}.

A curva de DSC realizada para a verificação da faixa de fusão do BNZ (Figura 4) na razão de 10°C.min⁻¹ evidenciou um pico endotérmico correspondente a temperatura do ponto de fusão de 191,68 °C com valor de reação com ΔE de -119,71 J.g⁻¹ correspondente a faixa de fusão relatada na literatura^{4,17}. Quando esse experimento é realizado com pequenas

variações de temperatura do pico de fusão mesmo que em diferentes razões de aquecimento, revela indícios da ausência de polimorfos.

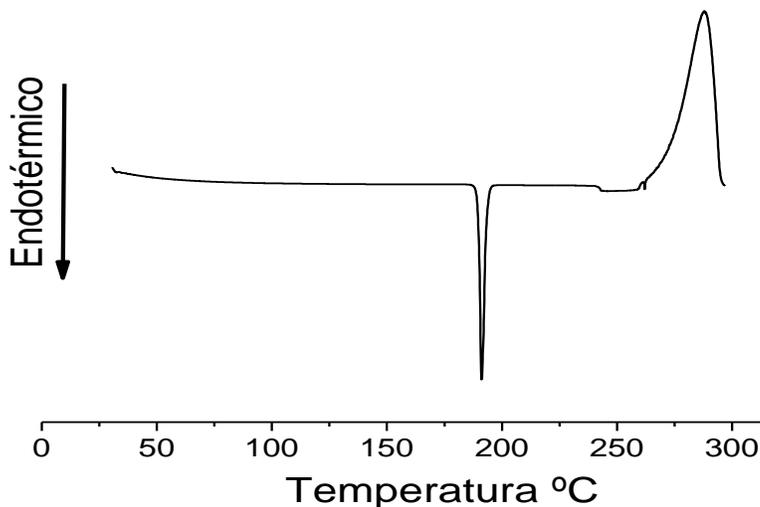


Figura 4: Curva de DSC do BNZ para verificação da faixa de fusão

Ainda para a verificação de polimorfos no BNZ (Figura 5), realizou-se por DSC um aquecimento inicial, na razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, para a verificação do ponto de fusão do fármaco, correspondente ao pico endotérmico de $191,68^{\circ}\text{C}$, como relatado inicialmente na verificação da pureza do BNZ e, posteriormente, através de resfriamento da amostra fundida, induziu-se a recristalização do fármaco, com o objetivo de verificar, através de um segundo aquecimento, mudanças da rede cristalina pela formação de arranjos estruturais diferentes, devido às variações das condições de temperatura sofridas, podendo haver a formação de estruturas metaestáveis, o que seria verificado pela alteração do ponto de fusão inicial. Contudo, nesse caso, verificou-se a ausência de polimorfos, devido a não modificação do pico endotérmico do BNZ.

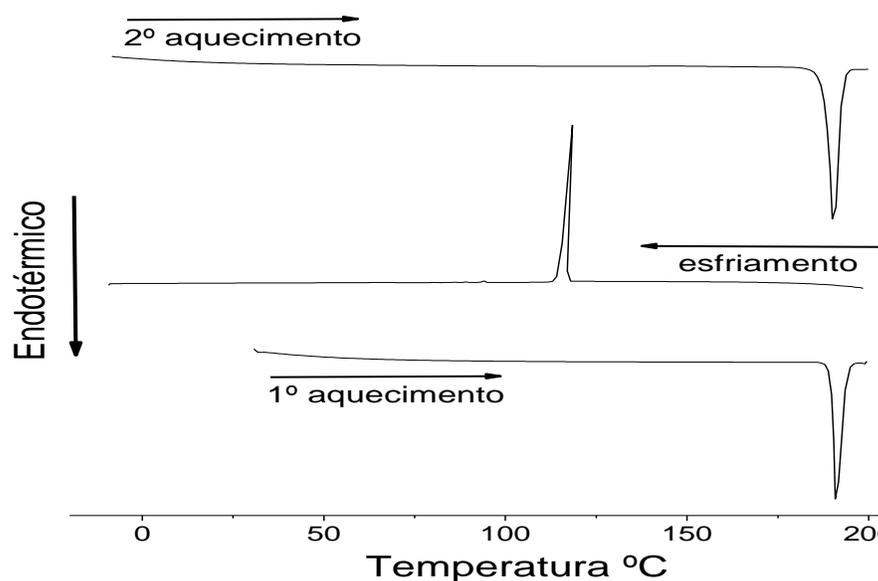


Figura 5: Curva de DSC do BNZ para verificação de polimorfos

Soares-Sobrinho e colaboradores⁴ realizaram estudos de compatibilidade de pré-formulados a base de BNZ através de análise termogravimétrica (TGA), utilizando excipientes consagrados na indústria farmacêutica para a compressão direta, como as celuloses microcristalinas (CM) 102 e 250, lactose anidra e glicolato de amido sódico.

Os estudos termogravimétricos do BNZ e de suas misturas binárias utilizando TG, demonstram inicialmente que o BNZ isolado é termicamente estável até 233,76°C e apresenta etapa principal de decomposição entre 233,76 a 319, 35°C, com perda de massa de 43,32%, comprovando compatibilidade entre fármaco e excipientes.

Espectroscopia no Infravermelho

No setor farmacêutico, é usada em inúmeras aplicações, como identificação de fármacos, avaliação da pureza, estudos de compatibilidade e freqüentemente, cristalinidade e discriminação de polimorfos, para avaliar se as condições experimentais foram

adequadamente estabelecidas, uma vez que o polimorfismo pode ser a causa de diferenças no desempenho de formulações farmacêuticas^{18,19}.

O espectro no IV do BNZ (Figura 6) apresenta picos característicos, principalmente com relação as bandas típicas das amidas (vibração de estiramento N-H), estiramento de carbonila (banda amida I) e deformação N-H (banda amida II), além das vibrações devidos aos grupos benzílico e imidazólico, e em particular, ao grupo nitro. A banda devido as vibrações de estiramento N-H, encontra-se em 3330 cm^{-1} . A banda de estiramento da carbonila encontra-se em 1685 cm^{-1} e a deformação de N-H (amida II) em 1565 cm^{-1} , característica da amida secundária. Além dessas, a banda em 1318 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-N. O conjunto de bandas em $3180, 3160, 3120, 3090$ e 3000 cm^{-1} surgem das vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de metileno do grupo benzila e o estiramento dos C-H's aromáticos, embora estejam em região de onda maior do que o previsto.

A região dos harmônicos e bandas de combinação (2000 a 1667 cm^{-1}), freqüentemente útil na determinação do número e posição de substituintes em anéis aromáticos, parece pouco informativa no espectro, não sendo observadas as quatro bandas de pequena intensidade que caracterizariam o benzeno monossustituído presente na molécula. A banda em 1380 cm^{-1} é relativa à vibração do estiramento simétrico do grupo nitro; enquanto que o estiramento deve-se à banda assimétrica em 1498 cm^{-1} , parcialmente encoberta pela banda de maior intensidade em 1515 cm^{-1} , não excluindo a possibilidade de que esta banda também esteja relacionada ao estiramento assimétrico do grupo nitro. Na região de menor freqüência, podemos atribuir as bandas de 1265 e 1180 cm^{-1} a vibrações de deformação C-H no plano e fora do plano, respectivamente, no anel imidazólico. Na freqüência de 713 cm^{-1} encontramos ainda a vibração de deformação fora do plano da fenila.

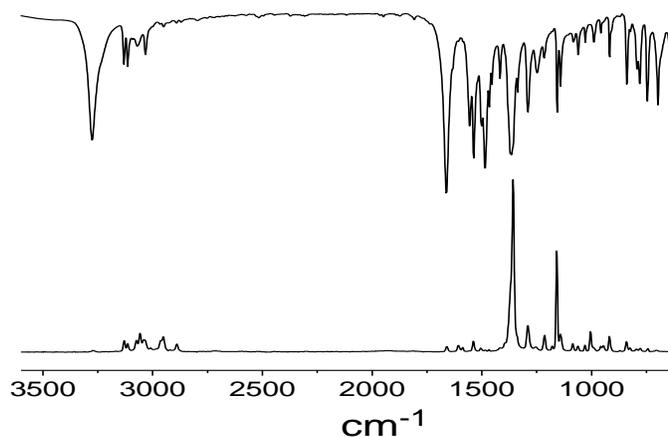


Figura 6: Espectro do BNZ no IV e pela técnica de Raman

Microscopia Eletrônica de Varredura

O tamanho de partícula e o estado cristalino do fármaco influenciam diretamente o perfil de dissolução, podendo a superfície efetiva apresentada pelo fármaco ser diretamente proporcional ao tamanho das partículas do mesmo¹⁸. O tamanho e a morfologia das partículas dos componentes da formulação também podem interferir na estabilidade química dos produtos farmacêuticos, podendo promover alteração da aparência do produto e na uniformidade de dose²⁰. Para a análise desses parâmetros, comumente utiliza-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura.

Com esta finalidade, obteve-se fotomicrografias das amostras de BNZ, apresentadas na Figura 7, onde foi observado o aspecto cristalino e irregular das partículas do fármaco, confirmando os resultados das análises do difratograma de Raios-X. Os resultados obtidos por essas técnicas auxiliam na compreensão dos dados encontrados nos estudos de dissolução realizados com o fármaco.

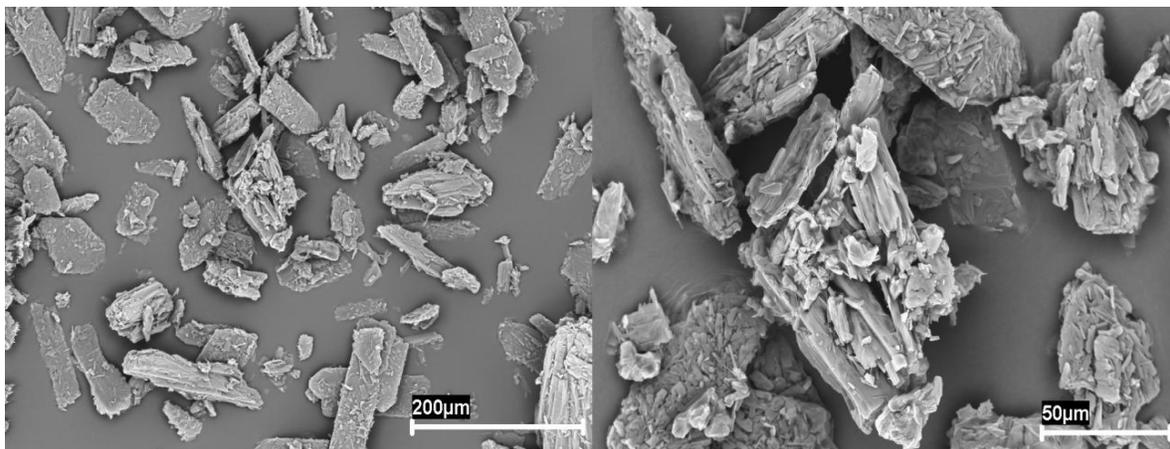


Figura 7: Fotomicrografias por MEV dos cristais do BNZ.

Estudo de Dissolução

Substâncias cristalinas, como o BNZ, apresentam suas moléculas dispostas em um arranjo cristalino definido⁹ são caracterizadas por propriedades peculiares no que diz respeito a sua solubilização, sendo possível correlacionar a estrutura do retículo cristalino com o ponto de fusão e a velocidade de dissolução. Verifica-se que fármacos com alto ponto de fusão possuem um retículo cristalino forte e conseqüentemente a remoção das suas moléculas torna-se um processo extremamente energético, o que acarreta sua baixa velocidade de dissolução²¹.

O sucesso no desenvolvimento de novos fármacos requer não apenas estudos de otimização das interações ligante-receptor, como também é preciso que o fármaco atinja seu alvo. Para que a absorção do fármaco ocorra é necessário que as suas moléculas estejam em solução no local de absorção. Logo, a dissolução da forma farmacêutica sólida nos fluidos gastrintestinais é um pré-requisito para que ocorra a absorção seguida da distribuição do fármaco para a circulação sistêmica, dependente em parte, da solubilidade do fármaco no meio que o rodeia²².

A existência de polimorfos é uma das principais fontes de variação no comportamento de dissolução dos fármacos, sendo que a influência sobre a velocidade de

dissolução é determinada pelas mudanças na solubilidade dos distintos polimorfos. Por isso há uma necessidade prática de se caracterizar as formas sólidas de uma substância através de estudos de dissolução, que podem ser produzidas por processos farmacêuticos convencionais: cristalização, moagem, secagem por congelamento, pulverização, dispersão sólida, entre outras^{13,19}.

Para fármacos da classe II, como o BNZ, a escolha do meio deve ser realizada de forma criteriosa, alguns meios propostos são claramente não fisiológicos, o que pode ser aceitável para controle de qualidade, mas não quando se deseja fazer alguma inferência sobre o comportamento *in vivo* da formulação, para produtos que contenham fármacos pouco solúveis em água recomenda-se o uso de surfactantes²³ com o objetivo de atingir a condição *sink*²⁴.

Devido sua baixa solubilidade, relacionada a suas características físico-químicas, evidenciou-se que a taxa de dissolução do BNZ foi lenta, sendo de 29,4% de BNZ dissolvido no intervalo de 60 minutos, apresentando eficiência de dissolução nos tempos 15 e 20 min de $12,30 \pm 1,23$ e $14,2 \pm 1,29$ respectivamente. Tais resultados apontam que a vetorização desse ativo é relevante diante das características intrínsecas da molécula, comprovados pelos dados publicados anteriormente por Soares-Sobrinho e colaboradores^{8,25}.

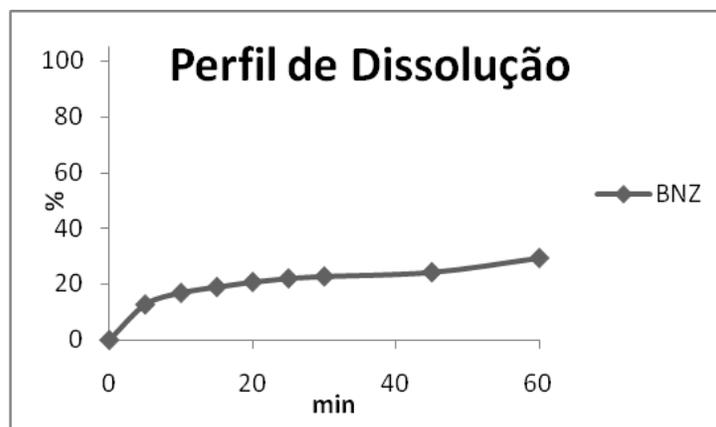


Figura 8: Perfil de dissolução do BNZ

CONCLUSÃO

Para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica estável e com percentuais de biodisponibilidade adequados é necessário conhecer as propriedades físicas e químicas dos fármacos, principalmente de baixa solubilidade como o BNZ. Este estudo foi considerado significativo para a caracterização deste fármaco, o qual forneceu informações necessárias para o desenvolvimento das formas farmacêuticas, além da utilização de técnicas que possibilitam o incremento da solubilidade do fármaco. As diversas técnicas utilizadas na caracterização são de indispensável importância, pois permitiram a determinação de várias características como o ponto de fusão, a confirmação da ausência de polimorfos e da conformação da molécula do BZN, morfologia e geometria do cristal, podendo essas características influenciarem significativamente na velocidade de dissolução de produtos farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

1. Rodrigues, O. P.; Cardoso, T. F. M.; Silva, M. A. S.; Matos, J. R.; *Acta Farm. Bonaerense*. **2005**, 24 (3), 383.
2. 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.; *Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl.* **2006**, 27 (2), 151.
3. Nery, C. G. C.; Pires, M. A. S.; Pianetti, G. A.; Vianna-Soares, C. D.; *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2008**, 44 (1), 61.
4. Soares-Sobrinho, J. L. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2007.
5. Silva, A. L. M.; Soares-Sobrinho, J. L.; Rolim-Neto, P. J.; Silva, R. M. F.; Medeiros, F. P. M.; Lima, L. G.; *Quim. Nova* **2007**, 30 (5), 1163.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

6. Soares-Sobrinho, J. L.; Silva, A. L. M.; Grangeiro-Júnior, S.; Medeiros, F. P. M.; Rolim-Neto, P. J.; *Rev. Bras. Farm.* **2006**, 87 (3), 78.
7. Soares-Sobrinho, J. L.; Lopes, Q. P.; Santos, F. S.; Soares, M. F. R.; Correa, L. P. Macedo, R. O.; Romil-Neto, P. J.; *J. Therm. Anal. Cal.*, submetido.
8. Soares-Sobrinho, J. L.; Lima, L. N. A.; Perrelli, J. D. C.; Silva, L.; Medeiros, M. F. P.; Soares, M. F. L. R.; Rolim-Neto, P. J.; *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2008**, 44 (3), 383.
9. Soares-Sobrinho, J. L.; Cunha-Filho, M. S. S.; Rolim-Neto, P. J.; Torres-Lambadeira, J. J.; Dacunha-Marinho, B.; *Acta Cryst. E.* **2008**, E64, 634.
10. Soares-Sobrinho, J. L.; Medeiros, F. P. M.; Roca, M. F. L.; Silva, K. E. R.; Lima, L. N. A.; Rolim-Neto, P. J.; *Revista de Patologia Tropical*, **2008**, 36 (2), 103.
11. Pugens, A. M.; Donaduzzi, C. M.; Melo, E. B.; *Rev. Eletrôn. Farm.* **2008**, 1, 32.
12. Khan, K. A.; Rhodes, C. T.; *Pharm. Acta Helv.* **1970**, 47, 594.
13. Napolitano, H. B.; Camargo, A. J.; Vencato, I.; Lariucci, C.; Ellena, J.; Cunha, S.; *Estudos* **2005**, 32 (11), 2021.
14. Costa, L. L. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.
15. Cunha-Filho, M. S. S.; Sá-Barreto, L. C. L.; *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2007**, 28 (1), 1.
16. Rodante, F.; Vecchio, S.; Catalani, G.; Tomassetti, M.; *Farmaco* **2002**, 57, 833.
17. *Farmacopéia Brasileira*, 4^a. ed. , Atheneu: São Paulo, 1988. p.177-178.
18. Brandão, F. C.; Berti, L. F.; Silva, M. A. S.; Stulzer, H. K.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, 27 (4), 560.
19. Froehlich, P. E.; Gasparotto, F. S.; *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2005**, 26 (3), 205.
20. Figueiredo, M. A. J.; Laporta, L.; Monografia de Curso de Especialização em Análise de Registros de Medicamentos, Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, Brasil, 2003.

21. Alton, M. E.; *Delineamento de Formas Farmacêuticas*, 2.ed., Ed. Artmed: Porto Alegre, 2005.
22. Lachman, L.; Lieberman, H.; Kanig, J. L.; *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Calouste Gulbekian: Lisboa, 2001.
23. Food and Drug Administration. US Department of Health and Human Services (CDER), 1997.
24. Azami, S.; Roa, N.; Lobemrg, R.; *Int. J. Pharm.* **2007**, 328, 12.
25. Soares-Sobrinho, J. L.; Cunha-Filho, M. S. S.; Rolim-Neto, P. J.; Torres-Labandeira, J. J.; *Int. J. Pharm.*, no prelo.

Capítulo III

5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO (CICLODEXTRINA E BENZNIDAZOL) EM SOLUÇÃO

5.1 Artigo IV – **Investigation of benznidazole-cyclodextrin complexes: the new perspective for chagas disease treatment**

Artigo submetido ao International Journal of Pharmaceutics

5.1 Artigo IV – **Investigação do complexo benznidazol-ciclodextrina: Uma nova perspectiva no tratamento da doença de Chagas**

Investigation of benznidazole-cyclodextrin complexes: the new perspective for chagas disease treatment

Lyra, M.A.M.¹; Soares-Sobrinho, J.L.²; Tenório, R. P.⁴; Figueiredo, R. C. B. Q.³; Sandes, J. M.³; Santos, B. S.¹; Lima, A.A.N.¹, Fontes, D. A. F.¹; Santos, F. L. A.¹; Rolim, L.A.¹; Rolim-Neto, P.J.¹.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

²Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí (UFPI).

³Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),

RESUMO

A doença de Chagas é um problema de saúde pública na América Latina. A quimioterapia atual para essa doença ainda se baseia no único fármaco de escolha, o benznidazol (BNZ), mesmo sendo muito tóxico e de baixa solubilidade. Devido às suas características químicas, ciclodextrinas tem sido usada no incremento de solubilidade de diversos fármacos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar e caracterizar a formação de complexos de inclusão (CI) do BNZ com a randomicamente metilada- β -ciclodextrina (RM- β -CD) em solução aquosa. A formação do complexo foi avaliada pelo diagrama de solubilidade de fases, estudos de ressonância magnética nuclear e estudos de fotoestabilidade. A atividade tripanocida *in vitro*, bem como a citotoxicidade em células de mamíferos foram também investigados tanto para o BNZ como para os complexos BNZ:RM β CD. O diagrama de solubilidade de fases observado foi do tipo A_L, evidenciando a formação de CI solúveis de estequiometria 1:1, confirmada pelo método de variação contínua (Job's plot). Os ensaios de toxicidade mostraram que os CI foram capazes de diminuir os efeitos tóxicos causados pelo BNZ e que não interferiu na atividade tripanocida do BNZ. Neste sentido, a utilização de CI (BNZ:CD) é uma alternativa promissora para o

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

desenvolvimento de uma formulação líquida, segura e estável, e uma nova opção terapêutica para o tratamento da doença de Chagas.

PALAVRAS CHAVE: Citotoxicidade, estabilidade de fármacos, solubilidade.

ABSTRACT

Chagas disease is a serious health problem in Latin America. The Current chemotherapy for this illness is still based on benznidazole (BNZ), which is very toxic and has low solubility. Due to its chemical characteristics cyclodextrins have been proven to increase the solubility of several drugs. In this sense, in this work we aimed to characterize the inclusion complexes (IC) formed between BNZ and randomly methylated- β -cyclodextrin (RM β CD) in aqueous solution. The complex formation was evaluated by the phase solubility diagram, nuclear magnetic resonance and photostability assay. The *in vitro* trypanocidal activity, as well as the cytotoxicity against mammal cells of both BNZ and BNZ:RM β CD were also investigated. The phase-solubility diagram displayed an A_L type feature, evidencing the formation of soluble IC. The continuous variation method (Job's plot) showed the existence of a complex with 1:1 stoichiometry. Our toxicity assays demonstrated that IC were able to decrease the toxic effects caused by BNZ alone and that no interfered with the trypanocidal activity of the BNZ. In this sense, the use of CI (BNZ: CD) is a promising alternative for the development of a liquid formulation, safe and stable, and a new therapeutic option for the treatment of Chagas disease

KEYWORDS: cytotoxicity, drug stability, solubility.

INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são enfermidades de condições crônicas e debilitantes causadas por infecções parasitárias, bacterianas e outras, principalmente nas populações de baixa renda (FENWICK, ZHANG & STOEVEER, 2009).

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), pelo menos 1 bilhão de pessoas, um sexto da população do mundo, sofrem de uma ou várias doenças tropicais negligenciadas, entre elas, a tripanossomíase Africana (doença do sono) e Americana (doença de Chagas), pois são as mais comuns em áreas tropicais e subtropicais do mundo (ALP et al., 2009).

A doença de Chagas é uma doença endêmica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É considerado um problema de saúde pública na América Latina, afetando aproximadamente 10 milhões de indivíduos, com um adicional de 40 milhões de pessoas em risco de infecção (BARBOSA et al., 2009).

A quimioterapia atual da doença é o benzonidazol (BNZ) (fig. 1A), único fármaco de escolha para o tratamento da doença. As duas principais limitações deste fármaco são a baixa solubilidade e alta toxicidade (MEZENECV et al., 2009; SILVA et al., 2008). Mas a utilização de CI com ciclodextrinas (CDs) fornece uma maneira de incrementar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de diversos fármacos (GRILLO et al., 2008).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4 (JUN et al., 2007). Nessas moléculas, os grupos hidroxilas, primários e secundários estão orientados para o exterior do anel formado, na porção estreita e larga respectivamente, conferindo-lhe um exterior bastante hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica, onde as moléculas hóspedes ou parte delas são encapsuladas (HAIYEE et al., 2009; SÁ-BARRETO & CUNHA-FILHO, 2008).

As que são obtidas com maior rendimento são comumente conhecidas como CDs naturais e contém seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α CD), β -ciclodextrinas (β CD) e γ -ciclodextrinas (γ CD) respectivamente. Estas CDs, em particular a β -CD, possuem solubilidade aquosa limitada. Isto é provavelmente devido às ligações de hidrogênio intramoleculares relativamente forte na rede cristalina. Substituição de qualquer das ligações de hidrogênio que formam grupos hidroxila, resulta em melhoria em sua solubilidade em água (CANNAVÀ et al., 2008).

Entre os derivados de CDs de interesse farmacêutico incluem os derivados da β -CD, como a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), metil- β -ciclodextrina (M β CD) e a

randomicamente metilada β -ciclodextrina (RM β CD) (Fig.1B) (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

O objetivo do presente estudo foi investigar o incremento de solubilidade em água do BNZ e caracterizar os CI formados entre BNZ e CDs (fig. 1C) através do diagrama de solubilidade de fases, ressonância magnética nuclear e testes de fotoestabilidade. Assim como investigar a atividade tripanomicida e citotoxicidade em células de mamíferos. Este é um estudo fundamental para a obtenção de uma formulação líquida para ser usado como uma nova opção terapêutica para a doença de Chagas.

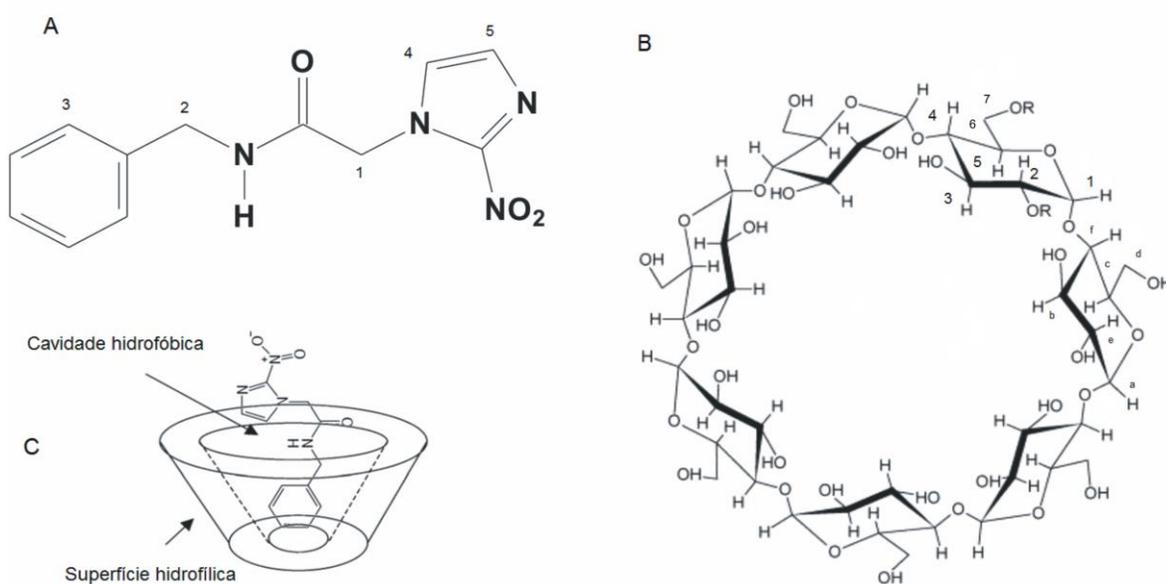


Figura 1. (A) Estrutura química do BNZ e (B) da ciclodextrina natural β CD (R = H) e RM β CD (R = CH₃), (C) representação do complexo de inclusão BNZ:CD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benzimidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

O BNZ, N-benzil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), α CD, β CD e γ CD foram doadas pela APSEN Farmaceutica[®] (São Paulo, Brasil), M β CD e RM β CD (com grau de substituição molar de 0,57) foi doada pela indústria Roquette (Barcelona, Espanha); HP β CD (com grau de substituição molar de 2,7) pela Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgica). A aquisição da água deuterada (D₂O) foi pela Tedia[®] (Brasil). Todos os outros materiais utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas utilizando água destilada e ultrapura (MILLI Q) e membranas filtrantes de porosidade de 0,22 μ m Millipore e de 0,45 μ m celulose (J'Prolab, PR).

Método Analítico

A quantificação do BNZ foi realizada pelo método espectrofotométrico UV e pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Soares-Sobrinho et al (2006) e Silva et al (2007). Os equipamentos utilizados foram um espectrofotômetro UV / vis da marca Micronal[®] modelo B582 no comprimento de onda de 324 nm e CLAE Shimadzu[®] (descrito na seção). A concentração média teórica da leitura foi de 20 μ g/mL.

Diagrama de Solubilidade de Fases

O diagrama de solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método anteriormente descrito (Higuchi e Connors, 1965). Quantidades excessivas de BNZ (5mg) foram adicionados aos 6mL de soluções contendo concentrações crescentes de β -CD e RM- β -CD, variando de 0 a 0,010 M e 0 a 0,050 M, respectivamente. As amostras foram agitadas em banho-maria termostático protegido da luz por 48h a 25°C (tempo em que o equilíbrio foi atingido) e posteriormente filtradas através de filtro de membrana de celulose 0,45 μ m para remover sólidos insolúveis. A quantificação do BNZ foi através do método

por espectrofotometria UV como descrito na seção, utilizando água como branco, verificando-se a especificidade do método utilizado.

A constante aparente de complexação (K) foi calculada a partir do diagrama de solubilidade de fase de acordo com a seguinte equação:

$$K = \frac{\text{slop}}{S_0 \cdot (\text{slop})} \quad (1)$$

onde S_0 é a solubilidade do BNZ a 25°C na ausência de ciclodextrina e o slope é a inclinação que corresponde o diagrama de solubilidade de fases.

A mudança na energia livre de Gibbs (ΔG) no processo de complexação foi determinada através da seguinte equação (Eq. 2) (junho et al., 2007).

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2)$$

onde R é a constante universal dos gases (8.314472 J. K⁻¹.mol⁻¹) e T é a temperatura em Kelvin (GRILLO et al., 2008a).

Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ¹H RMN unidimensional foram obtidos em um espectrômetro Varian UNITY plus 300 MHz, em D₂O. Os complexos foram obtidos pela mistura de BNZ (0,8 mM) e RMβCD em proporção molar 1:1 como descrito na Seção. As soluções foram adicionadas em tubos de 5 mm de RMN, totalizando um volume de 600μL. A temperatura do probe foi regulada em 20°C.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Os espectros de ^1H RMN foram adquiridos usando um único pulso, com 32 K numa janela espectral de 5000 Hz. Os FIDs foram corrigidos com um LB de 1 Hz antes da transformada de Fourier. O pico residual da água foi utilizado como referência.

Determinação da estequiometria pelo método de variação contínua (Job's plot)

A estequiometria da inclusão foi determinada pelo método desenvolvido por Job (1928), que se baseia na variação de um parâmetro físico-químico observado na presença de ciclodextrina e que pode ser medido por técnicas espectroscópicas, como RMN (ARAÚJO et al., 2007).

Soluções equimolar do BNZ e CD foram preparadas, misturadas e agitadas (por um período de 48 horas) de forma que a concentração total (M) permaneça constante ($M = [\text{BNZ}]_{\text{total}} + [\text{CD}]_{\text{total}} = 1\text{mM}$), variando-se a razão molar das espécies entre 0 e 1 (0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1,0). Como controles foram preparados amostras de BNZ nas mesmas proporções molares, porém sem a presença de ciclodextrina.

O parâmetro físico-químico diretamente relacionado com a concentração do complexo é representado em função da fração molar (r) do BNZ ou RM- β -CD, $r_{\text{BNZ}} = m / (m + n)$ ou $r_{\text{RM}\beta\text{CD}} = n / (m + n)$, onde m e n são as razões molares BNZ e RM- β -CD, no complexo, respectivamente. Para um dado valor de r , a concentração do complexo fármaco:ciclodextrina atingirá um máximo (Marcon et al., 2009).

A análise dos dados foi realizada através da relação de variação de deslocamento químico ($\Delta\delta = \{\delta_{\text{BNZcomplexo}} - \delta_{\text{BNZlivre}}\}$) em função de r .

Efeito da formação do CI no tempo de retenção do BNZ por CLAE

As análises por CLAE foram realizadas utilizando o equipamento Shimadzu ® com sistema controlador (Shimadzu SCL - 10VP), bombas A e B (Shimadzu LC - 10AD VP), detector UV-VIS (SPD-M10A VP), auto-injetor (Shimadzu SIL - 10AD VP), forno (Shimadzu CTO - 10AS) e os cromatogramas foram determinados através do programa Class - VP 6.14. Foram utilizadas as seguintes condições analíticas: coluna fase reversa Shimadzu ®, C₁₈, 5 µm, 15 cm × 0.46 cm, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 20 µL, comprimento de onda de 318 nm, temperatura de 30 °C e fase móvel: acetonitrila/água (50/50) (v/v), em que solução de RM-β-CD e BNZ foi dissolvido (0,4 mM).

De acordo com os estudos realizados por Grillo et al (2008), o tempo de retenção de fármacos podem ser governado pelos coeficientes de partição entre as fases móvel e estacionária, e que na presença de ciclodextrinas, há uma contribuição adicional no comportamento de retenção do fármaco, devido ao processo de complexação.

Estudo de Fotoestabilidade

O ensaio de fotoestabilidade foi realizado expondo 10mL de BNZ (0,8 mM) na presença e ausência de RM-β-CD (0,8 mM) na razão molar de 1:1 (fármaco:ciclodextrina). As suspensões foram filtradas através de membranas de 0,22 µm.

Os experimentos foram realizados utilizando como fonte de luz uma lâmpada UV 22W marca (Philips – Holland) (254nm), sendo a amostra irradiada a 15cm de distância da lâmpada. As amostras foram inseridas a uma temperatura de 28°C, amostradas em intervalos de tempo especificado (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) e a concentração de BNZ foi determinada por CLAE em intervalos de uma hora. Os resultados foram expressos em percentagem de BNZ por tempo de exposição. Cada teste foi realizado em triplicata. As condições do CLAE foram descritas na seção.

Atividade tripanocida

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa DM28c foram mantidas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 28°C. Para os experimentos, parasitas na fase exponencial de crescimento (5×10^6 células / ml) foram incubados por 48h em placas de 24 poços, com concentrações crescentes (0,0125 - 0,2 mM) de BNZ e BNZ: RM- β -CD na proporção molar 1:1, diluído em água ultrapura. Como controle foi utilizado células incubadas em meio LIT.

A morfologia e a motilidade dos parasitas foram monitoradas diariamente através de microscopia óptica. A densidade celular foi analisada por contagem direta em câmara de Neubauer e a IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular do parasita) foi determinada por regressão linear obtida pelo software SPSS 8.0 for Windows. Cada experimento foi realizado em triplicata e em dois experimentos independente.

Citotoxicidade

A citotoxicidade foi determinada pelo método MTT(brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico). Macrófagos peritoneais obtidos de Camundongos Balb/c foram mantidos em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 120 mg/ mL de sulfato de gentamicina, em placas de 96 poços e atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Para os ensaios, os macrófagos (10^5 células/ mL) foram incubados com concentrações crescentes (0.025 - 0,2 mM) de BNZ, RM- β -CD e BNZ: RM- β -CD na proporção molar de 1:1, por 48h. Posteriormente, os macrófagos tratados e não tratados foram incubados por 3 h, com 0,5 mg/ mL de MTT, a 37 °C.

Após a remoção do meio, o número de células viáveis foi determinado pela mensuração da quantidade de MTT convertido em formazan por desidrogenases mitocondriais. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido) sob agitação por 1h em temperatura ambiente. A absorbância foi medida usando o espectrofotômetro de microplacas a 570 nm. O tratamento estatístico dos dados foi realizado por uma análise de variância (one-way ANOVA).

Todos os experimentos envolvendo o uso de animais experimentais foram realizados em conformidade com as normas de ética da Fundação Oswaldo Cruz e foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA-FIOCRUZ L-0001/08).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diagrama de solubilidade de fases

De acordo com o espectrograma (Fig. 2), observou-se que a RM- β -CD não interferiu na quantificação do BNZ nos complexos BNZ:CD.

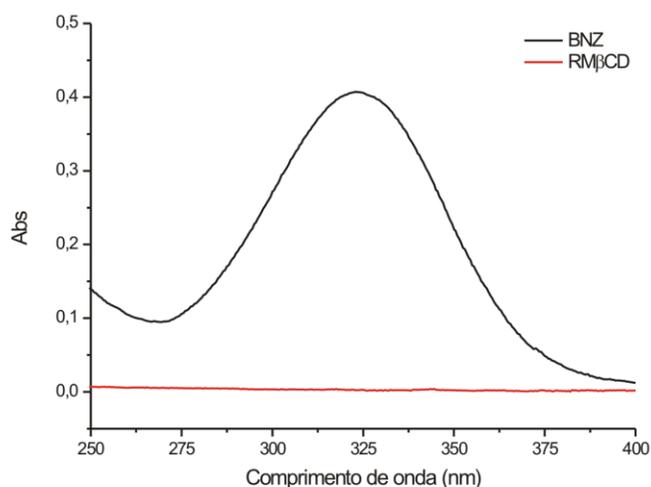


Figura 2. Varredura espectrofotométrica do BNZ em água.

A figura 3 mostra o diagrama de solubilidade de fases do BNZ na presença de várias concentrações e diferentes tipos de ciclodextrinas. Os resultados mostraram que a solubilidade do BNZ aumentou linearmente com a concentração das CDs, correspondendo, de acordo com Higuchi e Connors, ao perfil do tipo A_L , o qual está relacionado com a formação de um complexo de inclusão solúveis. O valor do declive (slope) de cada um

destes diagramas apresentou-se inferior a 1, sugerindo a formação de complexo com estequiometria 1:1.

De acordo com Jullian et al. (2008), o complexo CD/fármaco com estequiometria 1:1 é o tipo mais comum de associação, pois é quando uma única molécula de fármaco está incluído na cavidade de uma molécula de ciclodextrina, com uma constante de complexação ($K_{1:1}$) para o equilíbrio entre as espécies livres e associadas.

As constantes de complexação ($K_{1:1}$) e parâmetros termodinâmicos, como a mudança de energia livre de Gibb's (ΔG), estão listado na Tabela 1. As $K_{1:1}$ calculadas a partir do diagrama de solubilidade de fases demonstraram que apenas com a α -CD e γ -CD (constantes de 12,57 e 17,47 M^{-1} , respectivamente), não formaram complexo de inclusão estável com o BNZ, pois segundo Jun et al (2007), as constantes de associação de fármacos com CDs são relatadas na faixa de 50-2000 M^{-1} (JUN et al., 2007). Sugere-se então, que o tamanho do diâmetro da cavidade interna da α -CD (5Å) seja menor que o tamanho da molécula do BNZ e o da γ -CD (8Å) seja maior.

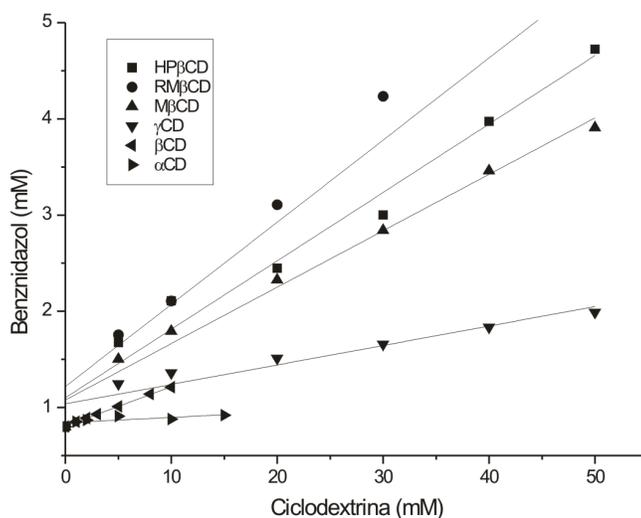


Figura 3. Diagrama de solubilidade de fase do BNZ com diferentes CDs em água a 25°C.

A eficiência de complexação aumentou na seguinte ordem: β -CD < M β -CD < HP- β -CD < RM- β -CD. O complexo BNZ:RM- β -CD foi o mais estável frente as diversas CDs

naturais e modificadas, observando-se a melhor eficiência na complexação e um maior incremento na solubilidade. Isto pode ser justificado pela presença de grupos de metila, uma vez que estes grupos são importantes para o alargamento da cavidade das CDs, favorecendo um ambiente mais hidrofóbico e a adaptabilidade dos fármacos, através de uma maior flexibilidade (MELO et al., 2008).

Tabela 1. Constantes aparente de complexação ($K_{1:1}$) e parâmetros termodinâmicos da complexação do BNZ com CDs determinada pelo diagrama de solubilidade de fases, 25°C.

Complexo de inclusão	Slope	Intercepto (10^{-3})	$K_{1:1}$ (M^{-1})	ΔG (kJ/mole)
BNZ: α -CD	0,0115	0,925	12,57	-6,27
BNZ: β -CD	0,0580	1,077	57,16	-10,02
BNZ: γ -CD	0,0178	1,037	17,47	-7,08
BNZ:M β -CD	0,0497	0,906	57,73	-10,04
BNZ:HP- β -CD	0,0711	1,101	69,52	-10,50
BNZ:RM- β -CD	0,0993	1,110	99,31	-11,37

As alterações nos parâmetros termodinâmicos durante complexação são fenômenos que resultam das mudanças na energia de interações de van der Waals, pontes de hidrogênios e interações hidrofóbicas entre fármacos e CDs.

Os valores calculados da energia livre de Gibbs para todas as ciclodextrinas foram $\Delta G < 0$, indicando que as complexações com CDs foram espontâneas e que são inversamente proporcionais com as constantes de complexação, ou seja, quanto menor for a variação de energia (mais negativo), maior será a eficiência de complexação (K_c).

Ressonância Magnética Nuclear

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

A espectroscopia de RMN é uma das ferramentas mais sensível para detecção da formação de CI entre CDs e uma variedade de moléculas hóspedes e para confirmação das estequiometrias dos CI (GRILLO et al., 2008b).

Variações químicas nos deslocamentos dos hidrogênios das CDs e dos compostos encapsulados podem fornecer evidências da formação de CI, uma vez que mudanças significativas no microambiente dos estados livres e complexados são detectados por esta ferramenta analítica. Então,

$$\delta f_{\text{obs}} = \chi_f \delta f_f + \chi_b \delta f_b \quad (4)$$

onde δf_{obs} , δf_f , δf_b são a variação de deslocamento químico observado, deslocamento químico das espécies livres e deslocamento químico dos compostos complexados, respectivamente. Os símbolos χ_f e χ_b significam as frações de moléculas livres e ligadas (FIELDING, 2007).

A figura 4 mostra os espectros de ^1H RMN do BNZ livre (parte inferior), da RM- β -CD (meio) e o complexo BNZ:RM- β -CD (parte superior). Como resultado da complexação, a ressonância de hidrogênio aromático do BNZ (H-3) mostrou alterações significativas nos deslocamentos químicos, que ocorrem entre 7,2 e 7,3 ppm. Já os efeitos sobre os hidrogênios H-1 (5,15 ppm), H-2 (4,3 ppm), H-4 (7,13 ppm) e H-5 (7,36 ppm), em comparação com outros hidrogênios da molécula, foram menor, apresentando variações de deslocamento químico $<0,010$ ppm. Esta baixa variação é justificada por ser um sistema de troca rápida entre a associação de BNZ e CDs, onde os complexos com baixa afinidade de associação e pequena constante de dissociação (K_d), mostra a dificuldade de detectar a variação no deslocamento químico para os sinais de estados livres e complexados (FIELDING, 2007).

O baixo valor de K encontrado no diagrama de solubilidade de fases para o complexo BNZ:RM- β -CD ($99,31 \text{ M}^{-1}$) justifica a baixa variação no deslocamento químico dos hidrogênios que sofreram influência do microambiente da cavidade da CD. Significa ainda que a interação do complexo BNZ:RM- β -CD é fraca, mostrando que o BNZ estão mais no estado livre do que no estado complexado. Do ponto de vista do RMN, isso mostra

que a troca química entre os dois estados, ocorre em uma taxa é muito rápida em comparação com a escala de tempo do RMN.

Apesar da sobreposição de alguns sinais de ressonância, os hidrogênios da RM- β -CD (Ha), localizada no interior da cavidade do RM- β -CD, podem ser visto através de uma mudança de campo. Possivelmente o Ha são hidrogênios (H-5 e H-6) (Fig.1) dos grupos metil da RM- β -CD, baseado em sinais químicos atribuídos no espectro da β -CD (Fig.5).

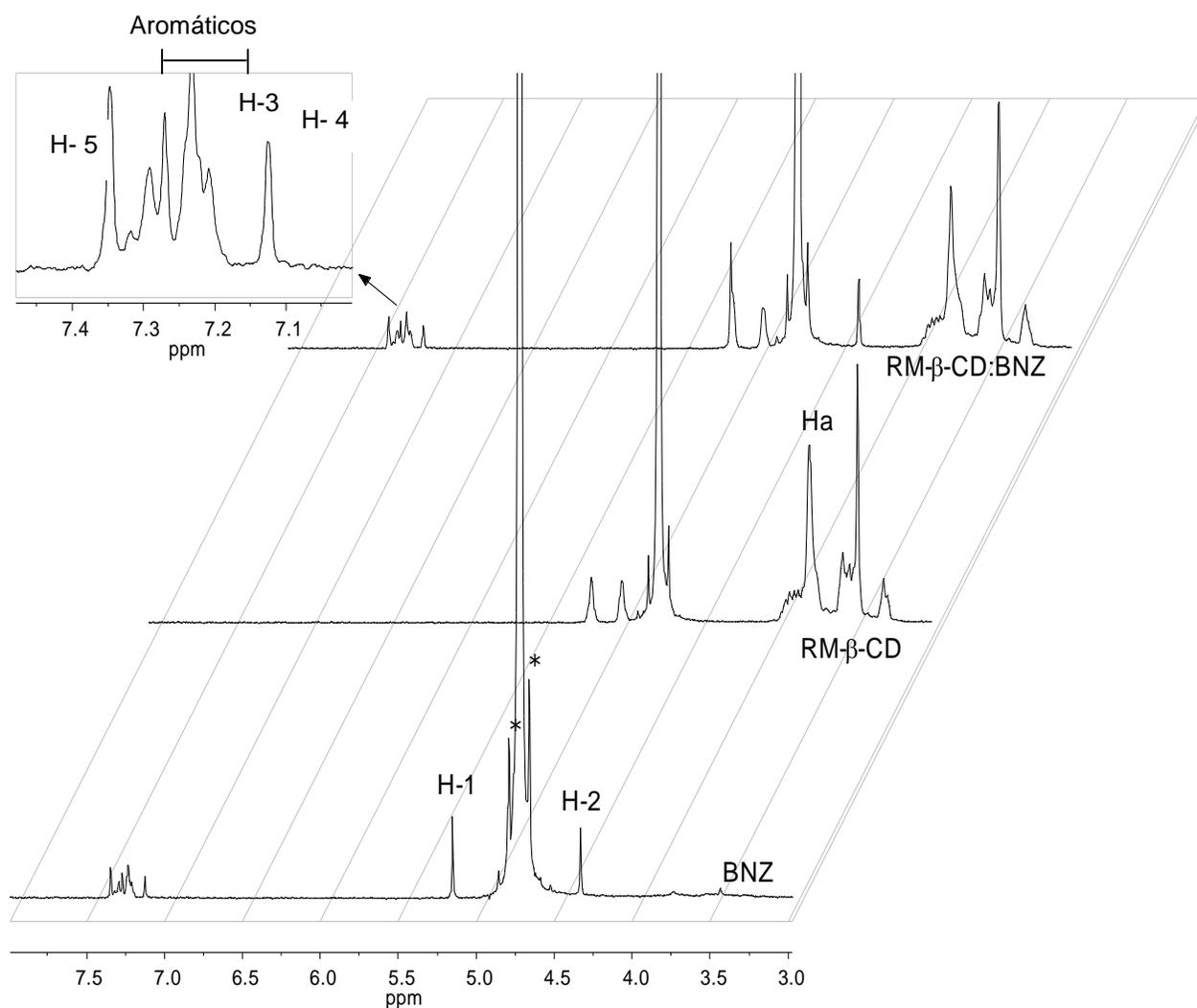


Fig. 4. Espectro de ^1H RMN (300 MHz) do BNZ (0.8 mM), RM- β -CD e BNZ: RM- β -CD (proporção molar 1:1). Amostras em D_2O at 25°C . Picos marcados com asterisco (*) são devido à rotação do spin.

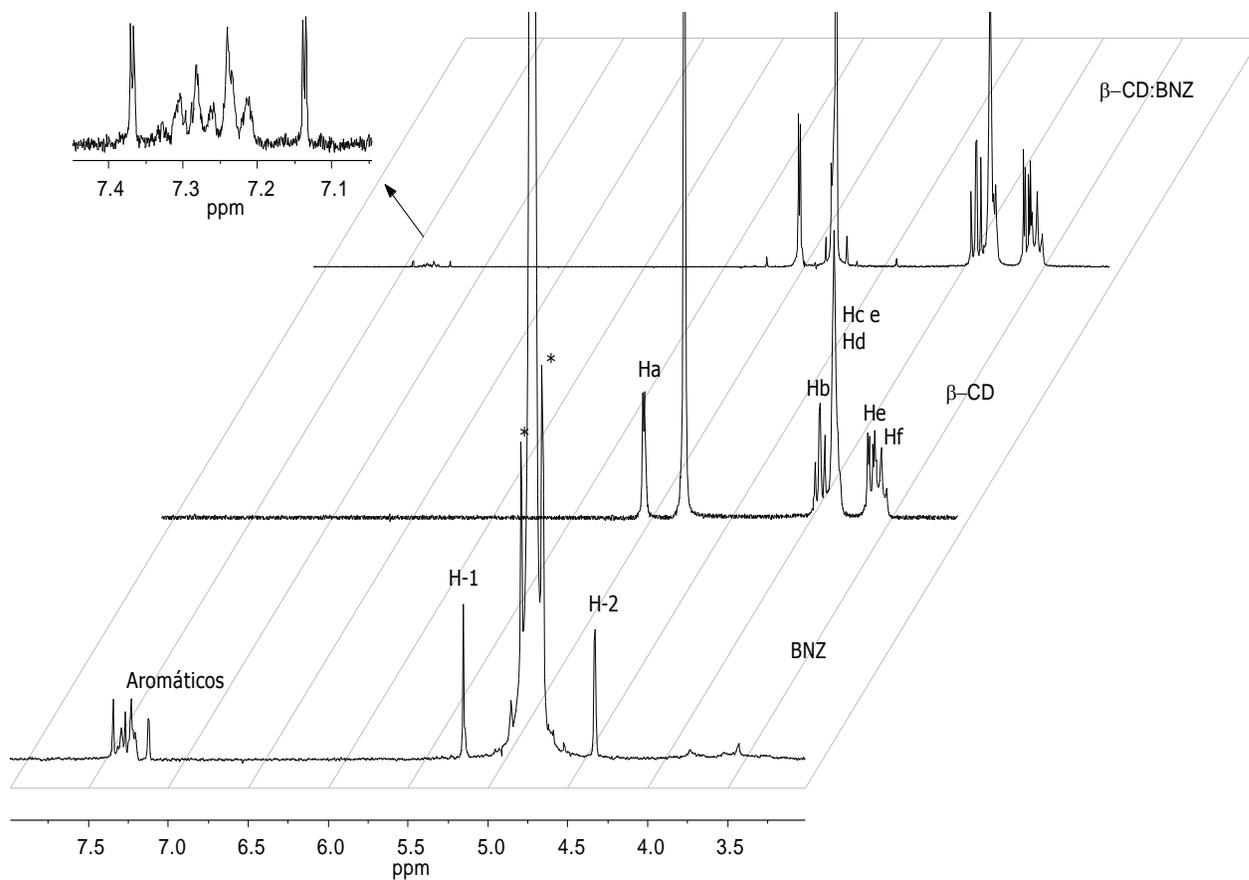


Fig. 5. Espectro de ^1H RMN (300 MHz) do BNZ (0.8 mM), β -CD e BNZ: β -CD (proporção molar 1:1). Amostras em D_2O at 25°C . Picos marcados com asterisco (*) são devido à rotação dos spins.

Determinação da estequiometria

O método de variação contínua foi aplicado para os hidrogênios das moléculas do BNZ e da CD, os quais apresentaram resultados idênticos. Os gráficos do BNZ e RM- β -CD que registaram as maiores mudanças são relatados na fig. 6. Em todos os casos, os Job's plots mostram um valor máximo em $r = 0,5$, indicando a existência de um complexo com estequiometria 1:1, dentro do intervalo de concentrações investigadas.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos no estudo de solubilidade de fases entre BNZ e RM- β -CD.

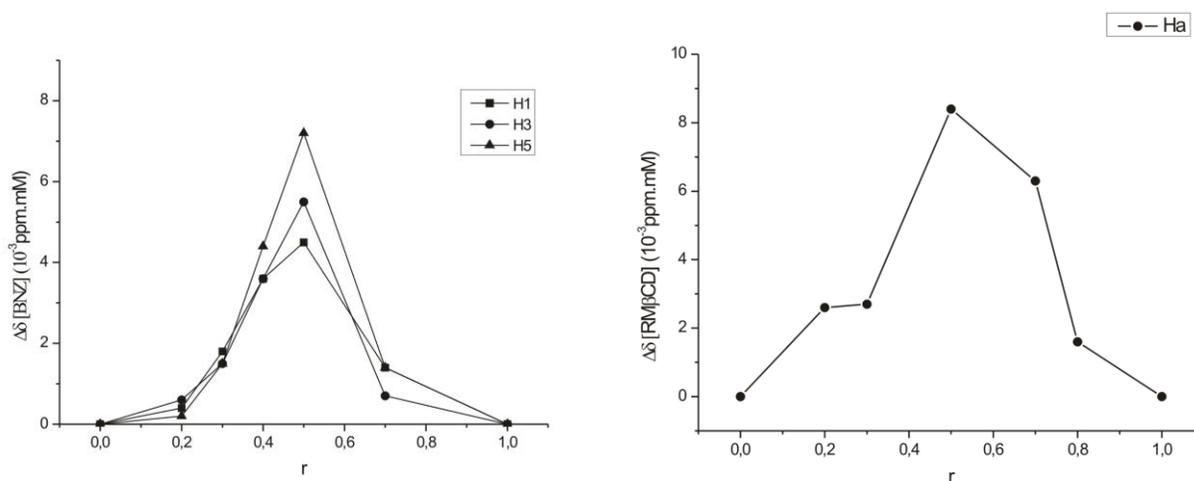


Fig. 6. Job's plots correspondendo ao deslocamento químico dos hidrogênios (a) BNZ e da (b) RM- β -CD (Ha).

Os prótons das moléculas incluídas na cavidade da RM- β -CD sofreram alterações no deslocamento químico devido a mudanças no seu ambiente local, observadas na figura 7. Com o aumento da razão molar do fármaco, as maiores variações foram observadas para

as ressonâncias dos hidrogênios do BNZ (H-3, H-4 e H-5). Como esperado, nenhuma mudança significativa para os hidrogênios (H-1 e H-2) (Fig. 7B), pois são os prótons da parte da molécula que sofrem menos influência na cavidade da CD.

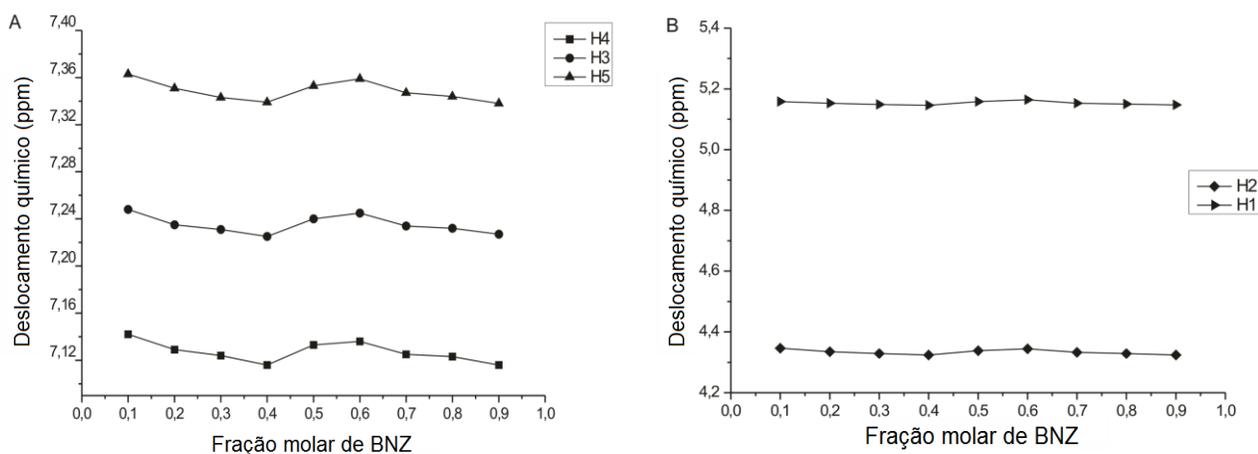


Fig. 7. (A) Variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do BNZ (H-4, H-3 e H-5), plotados em função da fração molar. (B) Variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios (H-2 e H-1), plotadoa em função da fração molar.

Efeito da formação do CI no tempo de retenção do BNZ por CLAE

Quando as ciclodextrinas são adicionadas à fase móvel, a retenção do soluto é conduzida pela divisão entre as fases móvel e estacionária e a complexação do soluto com as CDs. Os fatores de capacidade foram calculados para o soluto na presença de RM- β -CD de acordo com o tempo de retenção do analito e do tempo morto (MARÇON et al., 2009).

A variação nos tempos de retenção obtida foi inferior a 1% (Fig. 8). Essa variação do tempo de retenção do BNZ na fase móvel pode ser um indicativo da formação de complexo de inclusão, o que aumenta a solubilidade do BNZ na fase móvel e reduz seu tempo de permanência na coluna. Conforme também verificado por Grillo et al (2008), nos complexos da hidroximetilnitrofurazona com 2-hidripropil- β -CD.

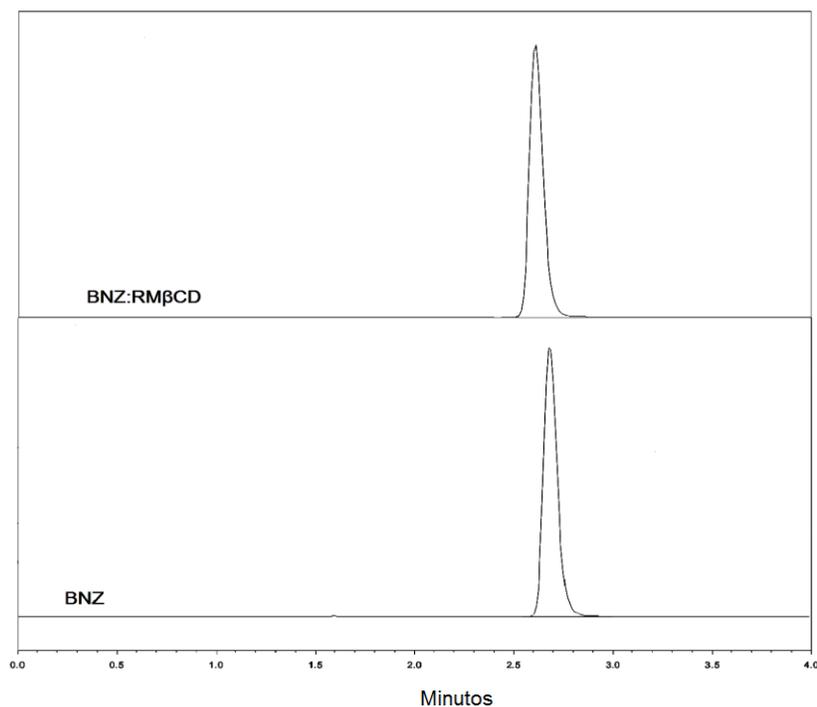


Fig. 8. Variação do tempo de retenção na presença de RM- β -CD (0,8 mM) a 25°C. Condições cromatográficas: coluna: Shimadzu®, C₁₈, 5 μ m, 15 cm \times 0.46 cm, fase móvel: acetonitrila/água (50/50, v/v).

Na literatura, também é descrito que a adição do solvente acetonitrila ou metanol podem ter efeito negativo sobre a formação de CI, um desses fatores é a quantidade de solvente orgânico, que pode resultar em uma fase móvel muito apolar em que as moléculas não-polares serão mais solúveis e, como consequência, a afinidade do soluto com a cavidade hidrofóbica das CDs diminui e parte da força motriz para a inclusão é removida (MELO et al., 2008). Outro ponto é que pode ocorrer competição entre o soluto e o solvente orgânico na cavidade das CDs, embora a ligação do solvente orgânico seja fraca.

Fotoestabilidade

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Neste estudo, a fotoestabilidade do BNZ e do complexo BNZ:RM- β -CD foram examinados em solução aquosa. A solução de BNZ em água na ausência de CD foi utilizada como controle. Os dados obtidos indicaram que a RM- β -CD retardou a fotodegradação do BNZ, tornando-o mais estável na presença de luz (Fig. 9). O mesmo efeito é descrito na literatura para outras drogas (GRILLO et al., 2008b).

Os dados revelaram que a adição de RM- β -CD não foi capaz de inibir a decomposição fotoquímica do BNZ:RM- β -CD, mas diminuiu a taxa de primeira-ordem aparente observada de decomposição fotoquímica do BNZ em uma relação não-linear. Esse resultado foi consistente com o sistema cinético em que o fármaco livre é degradado a taxas superiores ao fármaco complexado.

Constantes de degradação fotoquímica (K_{obs}) para BNZ na ausência e presença de RM- β -CD foram determinados pelos dados da figura 8, utilizando-se a cinética de primeira-ordem. Os valores de K_{obs} para BNZ na ausência e presença de RM- β -CD foram $9,17 \pm 0,12 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ e $6,49 \pm 0,09 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

A formação de CI teve um efeito estabilizador significativo sobre a fotodecomposição do BNZ comparada a sua forma livre em solução. No entanto, os valores observados K_{obs} estão muito além do efeito máximo esperado.

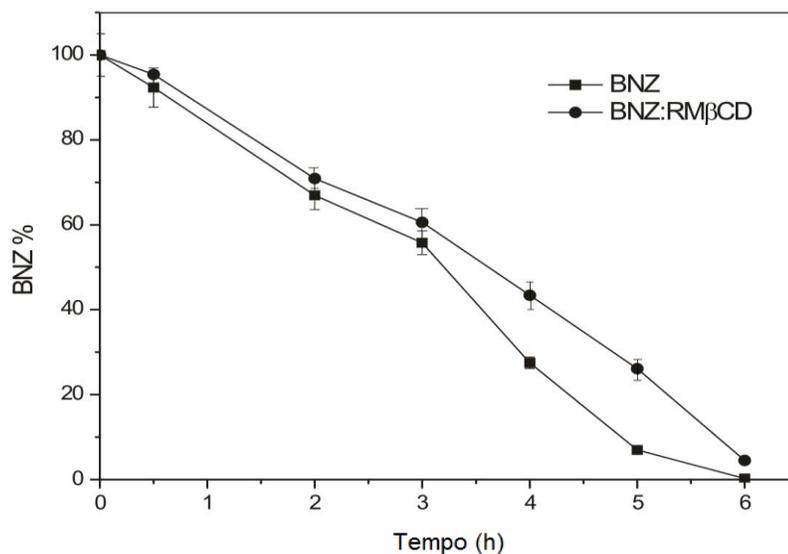


Fig. 9. Perfis de fotodegradação do BNZ e do complexo BNZ:RM- β -CD sob fotoexposição de radiação em solução aquosa.

Atividade tripanocida

A atividade tripanocida foi avaliada para BNZ livre e complexado. Os resultados obtidos são mostrados na figura 10. Os valores obtidos da IC_{50} para BNZ e para o complexo BNZ:RM- β -CD foram 0.037 e 0.027 mM, respectivamente. Tais valores mostram que a inibição de crescimento em ambas as amostras (BNZ e BNZ: RM- β -CD) foram semelhantes e de maneira dose e tempo-dependentes, atingindo 92% de inibição de crescimento em 0,2 mM (Fig. 10).

Esses resultados mostraram que a complexação do BNZ com ciclodextrinas não interferiu na atividade tripanocida deste composto, mantendo a integridade da molécula, como observado por outras análises.

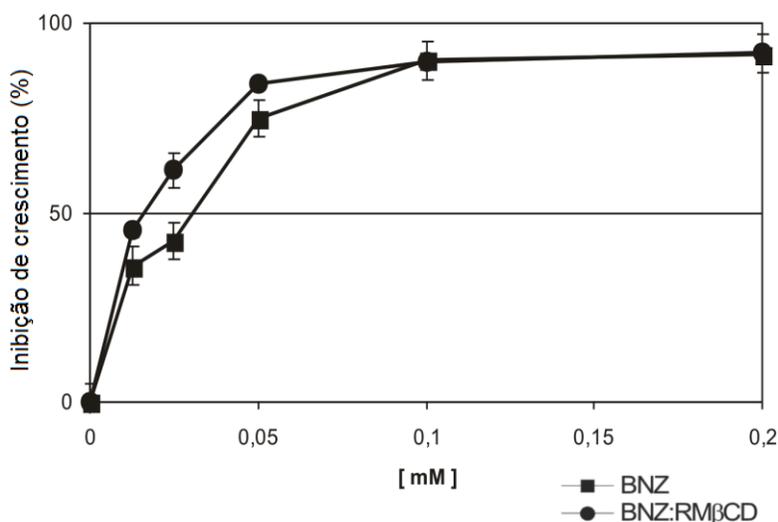


Fig. 10. Porcentagem de inibição do crescimento de forma epimastigotas de *T. cruzi* com a determinação da IC_{50} após 48 horas de cultivo do BNZ ($IC_{50} = 0,037$ mM) e do complexo BNZ: RM- β -CD ($IC_{50} = 0,027$ mM). Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade do BNZ e BNZ:RM- β -CD em células de mamíferos mostraram diferenças significativas entre BNZ e o complexo BNZ:RM- β -CD (Fig. 11). Como esperado e verificado por alguns autores com outros compostos (Grilo et al., 2008; MORAES et al., 2006; SOUZA et al., 2004), o complexo de inclusão BNZ:RM- β -CD, frente aos efeitos do BNZ livre na diminuição da viabilidade celular em até 71%, mostrou redução significativa desses efeitos citotóxicos.

A redução da citotoxicidade em macrófagos do BNZ:RM- β -CD pode ser explicada pelas diferenças de solubilidade dos complexos que são mais hidrofílicos que a forma pura do fármaco. Isto mostra a existência de uma relação direta entre a toxicidade celular e lipofilicidade. Como são bem conhecidas da literatura, as substâncias lipofílicas tendem a

apresentar mais efeitos citotóxicos do que os compostos hidrofílicos, devido à alta penetrabilidade destas moléculas nas membranas celulares (SOUZA et al., 2004).

A figura 11 ainda mostra o modelo *in vitro* dos efeitos citotóxicos do BNZ de maneira dose- dependente, sendo os efeitos protetores observados no tratamento com o complexo, explicado possivelmente pela liberação sustentada de BNZ livre da cavidade das CDs, como demonstrado pelos ensaios *in vitro* de liberação de fármacos (ARAÚJO et al., 2004).

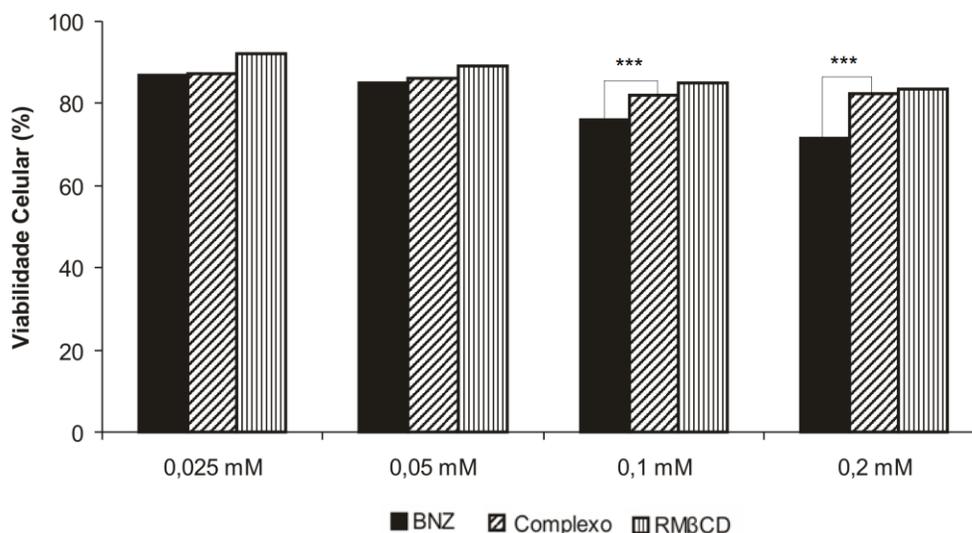


Fig. 11. Efeitos citotóxicos do BNZ, BNZ: RM-β-CD e RM-β-CD nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 mM em células de macrófagos incubadas por 48 h a 37°C e 5% CO₂. Dados expressados em % de viabilidade celular (cada ponto representa a média ± desvio padrão de 4 experimentos). *** Significância estatística com $p < 0,05$ (one-way ANOVA).

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostraram que a formação de CIs entre BNZ e RM-β-CD aumentou consideravelmente a solubilização do BNZ, diminuiu os seus efeitos nocivos em células de mamíferos e sem prejuízo na atividade tripanocida, agregou uma maior integridade química do BNZ em solução. Neste sentido, a utilização de CIs

(BNZ:CD) é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de uma formulação líquida, segura e estável, e uma nova opção terapêutica para o tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALP, M.; GOKER, H.; BRUN, R.; YILDIZ, S. Synthesis and antiparasitic and antifungal evaluation of 20-aryl substituted-1H,10H-[2,5]bisbenzimidazolyl-5-carboxamidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, p.2002–2008, 2009.

ARAÚJO, D.R.; CEREDA, C.M.; BRUNETTO, G.B.; PINTO, L.M.A.; SANTANA, M.H.; PAULA, E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Canadian Journal anaesthesia**, 51, 566-72.

ARAUJO, M.V.G.; VIEIRA, E.K.B.; LAZARO, G.S.; CONEGERO, L.S.; FERREIRA, O.P.; ALMEIDA L.E.; BARRETO L.S.; COSTA-JUNIOR, N.B.; GIMENEZ, I.F. Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, phase solubility and molecular modeling. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 15 (17), p. 5752-5759, 2007.

BARBOSA, V.S.A.; HOLANDA, C.MC.X.; CÂMARA, A.C.J.; SILVA, R.P.; OLIVEIRA, D.P.; MOREIRA, J.A.; MEDEIROS, A.C. *Trypanosoma cruzi*: Biodistribution of technetium-99m pertechnetate in infected rats. **Experimental Parasitology**, 123 (4), p. 309-312, 2009.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, p. 645–666, 2009.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benzimidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

CANNAVA, C.; CRUPI, V.; FICARRA, P.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R.; VENUTI, V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies. **Vibrational Spectroscopy**, 48, p. 172–178, 2008.

FENWICK, A.; ZHANG, Y.; STOEVEER, K. Control of the Neglected Tropical Diseases in sub-Saharan Africa: the unmet needs. **International Health** 1, p. 61-70, 2009.

FIELDING, L. NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, 51, p. 219–242, 2007.

FRANCO, C.; SCHWINGEL, L.; LULA, I.; SINISTERRA, R.D.; KOESTER, L.S.; BASSANI, V.L. Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex Characterization. **International Journal of Pharmaceutical**, 369, p. 5–11, 2009.

GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; FRACETO, L.F.; BRITO, C.L.; TROSSINI, G.H.G.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; MORAES, C.M. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Química nova**, 31, n.2, p. 290-295, 2008a.

GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; MORAES, C.M.; DE LIMA, R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Study of the interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 47, p.295–302, 2008b.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. Phase-solubility techniques. Advances in analytical chemistry and instrumentation. **Wiley-Interscience**, p. 117-212, 1965.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

JOB, P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. **Annali di Chimica**, 9, 113, 1928.

JULLIAN, C.; MORALES-MONTECINOS, J.; ZAPATA-TORRES, G.; AGUILERA, B.; RODRIGUEZ, J.; ARÁN, V.; OLEA-AZAR, C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, p. 5078-5084, 2008.

JUN, S. W.; MIN-SOO KIM, M.S.; KIM, J.S.; PARK, H. J.; LEE, S.; WOO, J. S.; HWANG, J. S. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 66, p.413–421, 2007.

MARÇON, F. ; MATHIRON, D. ; PILARD, S. ; LEMAIRE-HURTEL, A.S. ; DUBAELE, J.M. ; DJEDAINI-PILARD, F. Development and formulation of a 0.2% oral solution of midazolam containing γ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, 379, 2, p.244-250, 2009.

MELO, F,S,N.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; Interaction between nitroheterocyclic compounds with β - cyclodextrins: Phase solubility and HPLC studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 47, p.865-869, 2008.

MEZENCEV, R.; GALIZZI, M.; KUTSCHY, P.; DOCAMPO, R. Trypanosoma cruzi: Antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes in vitro. **Experimental Parasitology**, 122, 66–69, 2009.

MORAES, C.M.; ARAÚJO, D.R.; ISSA, M.G.; FERRAZ, H.G.; YOKAICHIYA, F.; FRANCO, M.K.K.D.; MAZZARRO, I.; LOPES, P.S.; GONÇALVES, M.M.; de PAULA, E.; FRACETO, L.F. Inclusion complexo f S(-)bupivacaine and 2-hydroxypropyl- β -

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

cyclodextrin: study of morphology and cytotoxicity. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 27 (3), p. 207-212, 2006.

SILVA, A. L. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; LIMA, L. G.; Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de benznidazol para a doença de Chagas, **Química Nova**, 30 (5), p.1163-1166, 2007.

SILVA, J.J.N.; PAVANELLI, W.R.; GUTIERREZ, F.R.S.; LIMA, F.C.A.; DA SILVA, A.B.F.; SILVA, J.S.; FRANCO, D.W. Complexation of the *anti-Trypanosoma cruzi*: Drug Benznidazole Improves Solubility and Efficacy. **Journal of Medical Chemical**, 51, p.4104-4114, 2008.

SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, A. L. M.; GRANGEIRO-JÚNIOR, S.; MEDEIROS, F. P. M.; ROLIM-NETO, P. J.; Desenvolvimento e validação do método analítico para o doseamento de benznidazol. **Revista Brasileira de Farmácia**, 87 (3), p. 78-80, 2006.

SOUZA, A.O.; SANTOS-JUNIOR, R.R.; SATO, D.N.; AZEVEDO, M.M.M.; FERREIRA, D.A.; MELO, P.S.; HAUN, M.; SILVA, C.L.; DURAN, N. Free 2-Propen-1-amine derivative and inclusion complexes with β -cyclodextrin: Scanning Electron Microscopy, Dissolution, Cytotoxicity and antimycobacterial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 15, n. 5, p.682-689, 2004.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

As caracterizações físico-químicas da matéria prima benznidazol forneceram informações detalhadas das características do fármaco através de diversas técnicas analíticas, como a determinação de ponto de fusão, confirmação da ausência de polimorfos, conformação da molécula do BNZ, morfologia e geometria do cristal.

A obtenção e caracterização dos complexos de inclusão possibilitaram um incremento significativo na solubilidade do BNZ, como também a diminuição dos seus efeitos nocivos em células mamíferos e sem prejuízo na atividade tripanocida. A formação de complexos de inclusão teve um efeito estabilizador sobre a fotodecomposição do benznidazol comparada a sua forma livre em solução.

Neste sentido, os complexos de BNZ serão muito promissores no desenvolvimento da formulação líquida estável e segura, como uma nova perspectiva no tratamento da doença de Chagas.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

- Realizar estudo de pré-formulação;
- Desenvolvimento de forma farmacêutica solução;
- Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação do teor do produto final;
- Estudo de estabilidade acelerado e longa duração da forma farmacêutica desenvolvida conforme a RE nº 1 de 29 de julho de 2005.
- Avaliação da atividade biológica das formulações nos modelos tripomastigotas e amastigotas.

Referências Bibliográficas

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITTO, M. A. F. O., JÚNIOR, C. S. N., SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p.882-888, 2004.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current pharmaceutical design**, v. 7, n. 12, p. 1157-1164, 2001.

MILLER, L.A.; CARRIER, R.L.; AHMED, I. Practical Considerations in Development of Solid Dosage Forms that Contain Cyclodextrin. **Journal of pharmaceutical Sciences**, v. 96, p.1691-1707, 2007.

RIBEIRO, L. S. S. Sistemas multicomponentes com ciclodextrinas como estratégias para otimizar a biodisponibilidade oral de fármacos. Universidade de Coimbra, p. 115-183, 2005.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of chagas disease control. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.

LYRA, M. A. M. Obtenção de complexos de inclusão benznidazol-ciclodextrina em solução para o combate da doença de Chagas.