

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**“HIDROSSOLUBILIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
BIOLÓGICA DO FÁRMACO ANTICHAGÁSICO  
BENZNIDAZOL”**

Flávia Pires Maximiano

Ouro Preto - MG  
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**“HIDROSSOLUBILIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
BIOLÓGICA DO FÁRMACO ANTICHAGÁSICO  
BENZNIDAZOL”**

Autora: Flávia Pires Maximiano

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares Cunha Filho

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Terezinha Bahia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ouro Preto - MG  
2011

M464h Maximiano, Flávia Pires.  
Hidrossolubilização e avaliação biológica do fármaco antichagásico  
benznidazol [manuscrito] / Flávia Pires Maximiano – 2011.  
xv, 150 f.: il. color., graf., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares Cunha Filho.  
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de  
Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Fármacos - Teses. 2. Chagas, Doença de - Teses.  
3. Formulação - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.015:616.937

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)



UFOP  
Universidade Federal  
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Farmácia



Sessão de defesa da 37ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **FLÁVIA PIRES MAXIMIANO** com a defesa da dissertação intitulada: “Hidrossolubilização e Avaliação Biológica do Fármaco Antichagásico Benznidazol”, avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 24 de fevereiro de 2011.

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Eliana Martins Lima  
Faculdade de Farmácia – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vanessa Carla Furtado Mosqueira  
Departamento de Farmácia - UFOP

Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Mato Grosso

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.*

*Fernando Sabino*

**DEDICATÓRIA**

Esse trabalho é dedicado a memória do meu avô José Pires Floriano.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me manter firme apesar das dificuldades, por ter colocado pessoas incomparáveis no meu caminho e ter me abençoado com mais essa conquista.

À minha família pelo amor, apoio e incentivo.

Ao meu orientador professor Dr. Marcílio Sérgio Soares Cunha Filho, por acreditar na minha capacidade e no meu trabalho, uma vez que não nos conhecíamos antes do meu ingresso no Cipharma. Muito obrigada pela oportunidade de realizar este projeto, pela orientação, dedicação, motivação e pelo apoio.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Terezinha Bahia, pela orientação, pela acolhida em seu laboratório e pela oportunidade de conviver em um grande laboratório de pesquisa com diversas pessoas que me fizeram sentir muito à vontade. Obrigada por sua contribuição e dedicação e seu estímulo durante a realização do estudo *in vivo* deste trabalho.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Vanessa Carla Furtado Mosqueira e Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Souza por terem cedido a infraestrutura de seus laboratórios para a realização dos ensaios da primeira e segunda partes deste trabalho.

Aos professores Dr. Aureliano Claret da Cunha (ENUT-DEALI), Dr<sup>a</sup>. Cláudia Martins Carneiro (EF-DEACL), Dr. Geraldo Magela da Costa (ICEB-DEQUI), Dr<sup>a</sup>. Kátia Monteiro Novack (ICEB-DEQUI), Dr. Leonardo Lagoeiro (EM-DEGEO), Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira (EF-DEACL), Dr<sup>a</sup>. Rosangela Barbosa de Deus (EF-DEFAR) e Dr. Versiane Abis Leão (EM-DEMET) que, gentilmente, permitiram a realização das análises instrumentais necessárias a este trabalho em seus respectivos laboratórios.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Mônica Cristina Teixeira, Dr<sup>a</sup>. Kátia Monteiro Novack e Dr. Orlando David Henrique dos Santos, pelos valiosos conselhos e contribuições durante a participação na banca de exame de qualificação.

Aos funcionários Délio Fernandes Lopes, Acácio Manoel de Carvalho, Marcelo Augusto Alves Costa, Ludmilla Walter Reis Mota, Ana Salomé Mendes e Daniela Batista Santos pela paciência com os meus “onde fica isso?” “onde eu acho isso?” e pelas palavras de carinho e incentivo.

Aos acadêmicos de Iniciação Científica: Lívia Maria de Paula, Guilherme Hideki Costa, Ana Lia Mazzeti Silva e Thiago Guimarães pelo auxílio no trabalho prático, pelo companheirismo e empenho.

Aos todos meus colegas do laboratório de Parasitologia (Doença de Chagas) pela colaboração, amizade e pelos momentos de descontração. Em especial à Isabel Mayer, por todos os ensinamentos em lidar com os animais de experimentação.

Aos meus colegas mestrandos do Cipharma pelos conselhos, pela atenção, pela amizade e disposição em sempre ajudar.

Aos meus amigos da Escola de Minas, Flávio Luís, Camila, Flávio Luciano, Damaris, Sueli, Bruno, Sérgio, Gabriela Lanna, Adarlene, Patrícia, Leonardo, Mariana, Keici, Daniel e Vítor, pela amizade e força.

A minha grande amiga Isabel Cristina Braga, pela amizade, longas conversas, conselhos e por me ajudar a superar os momentos difíceis e por compartilhar comigo os momentos mais agradáveis de descontração.

Aos meus diletos amigos petianos, a professora- tutora Denise Aparecida Corrêa Moreira e ao programa PET que proporcionaram meus primeiros passos na carreira acadêmica. Obrigada a todos pela amizade, carinho e palavras de incentivo.

Ao Tânio César pelo amor e paciência imensuráveis.

À UFOP e Cipharma pela infraestrutura e apoio financeiro.



---

**RESUMO**

O benznidazol é um fármaco empregado para o tratamento da doença de Chagas, sendo o único recurso terapêutico disponível no Brasil para combater esta grave doença. Estudos mostram que apesar de sua efetividade pré-clínica, o benznidazol apresenta baixa solubilidade aquosa e errática biodisponibilidade, além de importantes efeitos colaterais que levam ao abandono da terapêutica, especialmente na fase crônica da doença. Desse modo, este trabalho propôs-se a desenvolver formas farmacêuticas sólidas a base de benznidazol, capazes de favorecer sua solubilidade e velocidade de dissolução e minimizar os problemas de biodisponibilidade relatados. Realizou-se, inicialmente, um estudo de pré-formulação através de uma detalhada investigação sobre as propriedades físico-químicas do benznidazol até então desconhecidas. Dados precisos de solubilidade, velocidade intrínseca de dissolução, tamanho e superfície de partícula e permeabilidade foram determinados. Uma pesquisa das possíveis formas polimórficas do benznidazol foi conduzida em várias condições de cristalização, sem que tenham sido detectadas formas meta-estáveis. No estudo de compatibilidade fármaco-excipientes, o benznidazol mostrou-se compatível com excipientes farmacêuticos de diferentes classes farmacotécnicas, apresentando-se incompatibilidade térmica apenas com o polímero polietilenoglicol. Durante os estudos de formulação, duas estratégias de solubilização do fármaco foram adotadas: a obtenção de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas inseridos em comprimidos efervescentes e a preparação de microcristais de benznidazol pela técnica de recristalização por mudança de solvente, inseridos em matrizes de comprimidos. As formulações produzidas apresentaram melhorias importantes no perfil de dissolução do fármaco. Os comprimidos contendo microcristais de benznidazol apresentaram o melhor desempenho *in vitro*, tendo sido selecionados para a realização de estudos de atividade biológica utilizando modelo murino para doença de Chagas. Os resultados *in vivo* demonstraram uma redução considerável na parasitemia e na mortalidade nos animais infectados, além de importantes incrementos nos percentuais de cura parasitológica, comparados com o tratamento comercial atualmente disponível. Desta forma, o estudo realizado aporta promissoras perspectivas de avanço na terapêutica antichagásica.

**ABSTRACT**

The benznidazole is a drug used clinically for the treatment of Chagas disease, the only therapeutic option available in Brazil to combat this serious disease. Studies show that despite its pre-clinical effectiveness, the benznidazole has low water solubility and bioavailability, and important side effects that lead to abandonment of therapy, especially in the chronic phase. Thus, this work seeks to develop solid dosage forms with benznidazole to favor its solubility and dissolution rate in order to minimize the problems of bioavailability reported. Initially, a study of pre-formulation was held through a detailed investigation into the physico-chemical properties of benznidazole hitherto unknown. Accurate solubility, intrinsic dissolution rate, particle size and surface area and permeability were determined. A survey of the possible polymorphic forms of the benznidazole was conducted at several crystallization conditions, without having been detected meta-stable forms. In the compatibility study performed against different pharmaceutical excipients, the benznidazole was compatible with pharmaceutical excipients of different functional classes presenting thermal incompatibility just with the polymer polyethylene glycol. During the formulation studies, two strategies of drug solubilisation were adopted: the production of inclusion complex using cyclodextrin in effervescent tablets and the preparation of benznidazole microcrystals by solvent change precipitation procedure and its incorporation in tablets matrices. The dosage form produced presented improvements in drug dissolution behavior. The BNZ tablets containing microcrystals by solvent change method presented the best performance *in vitro* and were selected to the biologic studies for Chagas disease. The *in vivo* results showed a considerable reduction in parasitemia and mortality of infected animals. Also, important progresses in parasitological cure compare with commercial treatment available were achieved. Therefore, this study brings promising perspectives in the therapeutic of Chagas disease.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> . .....	25
<b>Figura 2:</b> Fórmula estrutural do benznidazol .....	27
<b>Figura 3:</b> Estrutura molecular dos três tipos de ciclodextrinas, $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ . .....	31
<b>Figura 4:</b> Formação de complexos fármaco-CD com estequiometria 1:1 e 1:2. ....	31
<b>Figura 1. 1:</b> Curva de calibração do BNZ em solução metanol:água (1:1) no comprimento de onda 324nm. ....	42
<b>Figura 2. 1:</b> Aparato para determinação do ângulo de repouso e tempo de escoamento. ....	50
<b>Figura 2. 2:</b> Perfil de dissolução intrínseca do BNZ. ....	53
<b>Figura 2. 3:</b> Curvas de DSC do BNZ obtido em um ciclo de aquecimento-resfriamento-aquecimento (+200°C; -20°C; +300°C). ....	56
<b>Figura 2. 4:</b> Difratoograma de raios-X do pó e do monocristal do BNZ. ....	56
<b>Figura 2. 5:</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos cristais típicos de BNZ. ....	58
<b>Figura 2. 6:</b> Distribuição de frequência do tamanho de partículas de BNZ. ....	59
<b>Figura 2. 7:</b> Ângulo de repouso formado pelo escoamento forçado do BNZ. ....	60
<b>Figura 2. 8:</b> Isoterma de sorção de umidade de BNZ a 25°C. ....	61
<b>Figura 3. 1:</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos cristais de BNZ obtidos em algumas condições de recristalização .....	68
<b>Figura 3. 2:</b> Curva de DSC típica do BNZ. ....	69
<b>Figura 3. 3:</b> Curvas de DSC do BNZ recristalizado pelo método de cristalização pela adição de anti-solvente [CAA]. ....	70
<b>Figura 3. 4:</b> Curvas de DSC do BNZ recristalizado pelo método de cristalização por resfriamento do solvente [CRE]. ....	70
<b>Figura 3. 5:</b> Curvas de DSC do BNZ recristalizado pelo método de cristalização pela evaporação do solvente [CEV]. ....	71
<b>Figura 3. 6:</b> Difratoogramas de raios-X do pó obtidos a partir do BNZ recristalizado. ....	72
<b>Figura 3. 7:</b> Curvas de DSC do BNZ e das misturas físicas que não apresentaram variação no perfil térmico do BNZ. ....	74
<b>Figura 3. 8:</b> Curvas de DSC do BNZ, HP $\beta$ CD e da mistura física, BNZ+ HP $\beta$ CD. ....	75

<b>Figura 3. 9:</b> Curvas de DSC do BNZ, HEC, da mistura física, BNZ+HEC.....	75
<b>Figura 3. 10:</b> Curvas de DSC do BNZ, PEG e da mistura BNZ+PEG.....	76
<b>Figura 3. 11:</b> Espectro de FTIR do BNZ, HEC e suas respectivas misturas físicas recém-preparadas e após envelhecimento. ....	76
<b>Figura 3. 12:</b> Espectro de FTIR do BNZ, PEG e suas respectivas misturas físicas recém-preparadas e após envelhecimento. ....	76
<b>Figura 4. 1:</b> Representação esquemática das etapas de obtenção de microcristais de BNZ pelo método de recristalização por mudança de solvente. ....	81
<b>Figura 4. 2:</b> Representação esquemática método dos trapezóides proposto por Khan e Rhodes (1975). ....	84
<b>Figura 4. 3:</b> Perfil de dissolução do BNZ matéria-prima em condições <i>Sink</i> a 37°C. ....	89
<b>Figura 4. 4:</b> Perfis de dissolução dos microcristais de BNZ preparados com diferentes polímeros. ....	90
<b>Figura 4. 5:</b> Curvas de DSC dos microcristais de BNZ [BNZ <sub>PEG</sub> e BNZ <sub>HEC</sub> ], do BNZ matéria-prima, do HEC e do PEG isolados. ....	96
<b>Figura 4. 6:</b> Difractogramas de raios-X do pó de amostras de BNZ, HEC, PEG e dos microcristais BNZ <sub>HEC</sub> e BNZ <sub>PEG</sub> . ....	97
<b>Figura 4. 7:</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos microcristais de BNZ. ....	98
<b>Figura 4. 8:</b> Comprimidos obtidos a partir da formulação F2BNZ <sub>HEC</sub> .....	101
<b>Figura 4. 9:</b> Perfis de dissolução dos comprimidos (F1 e F2) e do Rochagan®.....	102
<b>Figura 5. 1:</b> Difractogramas de raios-X do pó de BNZ, HPβCD e seus complexos de inclusão em três níveis de concentração de HPβCD [CI <sub>alta</sub> , CI <sub>média</sub> e CI <sub>baixa</sub> ]......	112
<b>Figura 5. 2:</b> Curvas de DSC das amostras de BNZ, HPβCD, da mistura física [MF], e dos complexos de inclusão [CI <sub>baixa</sub> , CI <sub>média</sub> e CI <sub>alta</sub> ]. ....	113
<b>Figura 5. 3:</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de BNZ matéria-prima, da HPβCD e dos complexos de inclusão [CI] produzidos.....	114
<b>Figura 5. 4:</b> Perfis de dissolução das amostras de BNZ matéria-prima, CI <sub>baixa</sub> , CI <sub>média</sub> e CI <sub>alta</sub> . ....	115
<b>Figura 5. 5:</b> Resultados dos ensaios de peso médio e tempo de desintegração dos comprimidos efervescentes elaborados. ....	116
<b>Figura 5. 6:</b> Perfil de dissolução dos comprimidos efervescentes de BNZ e do comprimido comercial Rochagan®. ....	117

**Figura 5. 7:** Diagrama de contorno representando a ED<sub>15</sub> dos comprimidos efervescentes em função da concentração de HPβCD e de ME. .... 119

**Figura 5. 8:** Diagrama de contorno representando a absorção de água pelos comprimidos efervescentes em função da concentração de HPβCD e de ME. .... 120

**Figura 5. 9:** Diagrama de contorno representando a perda de água pelos comprimidos efervescentes em função da concentração de HPβCD e de ME. .... 121

**Figura 6. 1:** Protocolo de estudo 1 utilizado no tratamento da doença de Chagas experimental por 7 dias. .... 126

**Figura 6. 2:** Protocolo de estudo 2 utilizado no tratamento da doença de Chagas experimental por 20 dias. .... 126

**Figura 6. 3:** Log dos picos máximos de parasitemia apresentados por camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com diferentes doses de Rochagan<sup>®</sup> e F2BNZ<sub>HEC</sub>. .... 130

**Figura 6. 4:** Log dos picos máximo de parasitemia de camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, tratados por via oral com as formulações F2BNZ<sub>HEC</sub> e Rochagan<sup>®</sup>, nas doses 50 e 100mg/Kg de peso corporal. .... 133

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Diferentes formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	24
<b>Tabela 1. 1:</b> Dados de robustez do método analítico relativos à avaliação da composição do solvente no método e ao modo de leitura no espectrofotômetro. ....	41
<b>Tabela 1. 2:</b> Dados de especificidade do método analítico.....	41
<b>Tabela 1. 3:</b> Dados de exatidão do método analítico.....	43
<b>Tabela 1. 4:</b> Dados de precisão do método analítico. ....	43
<b>Tabela 2. 1:</b> Condições de umidade relativa obtidas a partir de soluções saturadas de diferentes sais, a 25°C. ....	51
<b>Tabela 2. 2:</b> Solubilidade do BNZ em diferentes solventes a 25°C. ....	52
<b>Tabela 2. 3:</b> Coeficiente de partição de BNZ. Dados baseados em valores experimentais e em estimativas <i>in silico</i> . ....	54
<b>Tabela 2. 4:</b> Valores de superfície específica e porosidade das partículas de BNZ obtidos através da análise de BET.....	57
<b>Tabela 2. 5:</b> Medidas de fluxo do BNZ. ....	59
<b>Tabela 3. 1:</b> Solventes empregados no preparo de soluções de BNZ para os ensaios de cristalização. ....	67
<b>Tabela 3. 2:</b> Formação de cristais nas diferentes condições de cristalização. ....	68
<b>Tabela 3. 3:</b> Dados térmicos do BNZ recristalizado nas diferentes condições de cristalização obtidos por DSC. ....	69
<b>Tabela 3. 4:</b> Dados térmicos dos outros eventos observados no DSC do BNZ recristalizado em diferentes condições.....	71
<b>Tabela 4. 1:</b> Composição das formulações a base de microcristais de BNZ. ....	86
<b>Tabela 4. 2:</b> Valores de ED <sub>20</sub> para microcristais obtidos através do uso de diferentes polímeros. ....	91
<b>Tabela 4. 3:</b> Dados de rendimento e ED <sub>20</sub> dos microcristais de BNZ preparados com PEG e HEC. ....	92
<b>Tabela 4. 4:</b> Doseamento dos microcristais de BNZ obtidos pela transposição de escala. ....	94
<b>Tabela 4. 5:</b> Eficiências de dissolução dos microcristais de BNZ.....	94
<b>Tabela 4. 6:</b> Propriedades de fluxo dos microcristais de BNZ. ....	94

<b>Tabela 4. 7:</b> Valores de densidade, superfície específica e porosidade dos microcristais de BNZ. ....	95
<b>Tabela 4. 8:</b> Solubilidade dos microcristais de BNZ em água destilada a 25°C. ....	99
<b>Tabela 4. 9:</b> Reologia da mistura dos microcristais e excipientes, na proporção de 1:2. ....	99
<b>Tabela 4. 10:</b> Reologia dos granulados obtidos por via seca. ....	100
<b>Tabela 4. 11:</b> Valores de pesos médios dos comprimidos. ....	101
<b>Tabela 4. 12:</b> Doseamento dos comprimidos obtidos a partir dos microcristais de BNZ. ....	101
<b>Tabela 4. 13:</b> Dados do ensaio de dureza e friabilidade (n=10). ....	102
<b>Tabela 4. 14:</b> Valores de ED <sub>20</sub> para diferentes formulações elaboradas e do Rochagan®. ....	103
<b>Tabela 5. 1:</b> Composição das formulações elaboradas a partir do planejamento fatorial. ....	108
<b>Tabela 5. 2:</b> Solubilidade do BNZ frente às diferentes ciclodextrinas testadas a 25 °C. ....	111
<b>Tabela 5. 3:</b> Dados térmicos do BNZ matéria prima, da mistura física [MF] de BNZ e HPβCD e dos complexos de inclusão [CI] produzidos. ....	113
<b>Tabela 5. 4:</b> Valores de ED <sub>15</sub> para o BNZ matéria-prima e complexos de inclusão [CI] produzidos. ....	115
<b>Tabela 6. 1:</b> Parâmetros biológicos avaliados em camundongos infectados com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados diariamente com as formulações de F2BNZ <sub>HEC</sub> e Rochagan® durante 7 dias. ....	131
<b>Tabela 6. 2:</b> Parâmetros biológicos avaliados em camundongos infectados com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados diariamente com as formulações F2BNZ <sub>HEC</sub> e Rochagan® durante 20 dias. ....	132
<b>Tabela 6. 3:</b> Dados dos testes de HC e PCR obtidos de camundongos infectados com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> , após 30 dias de tratamento com F2BNZ <sub>HEC</sub> e Rochagan®. ....	134

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BNZ = Benznidazol

BNZ<sub>HEC</sub> = Microcristais de BNZ produzidos com polímero hidroxietilcelulose

BNZ<sub>PEG</sub> = Microcristais de BNZ produzidos com polímero polietilenoglicol

CAA = Cristalização por adição de anti-solvente

CD = Ciclodextrinas

CEV = Cristalização por evaporação do solvente

CI = Complexo de inclusão

CNT = Controle não tratado

CRE = Cristalização por resfriamento do solvente

CV = Coeficiente de variação

DSC = *Differential Scanning Calorimetry*

EC = Etilcelulose

ED<sub>15</sub> = Eficiência de dissolução em 15 minutos

ED<sub>20</sub> = Eficiência de dissolução em 20 minutos

ESF = Exame de sangue a fresco

F1BNZ<sub>HEC</sub> = Comprimidos preparados com microcristais de BNZ produzidos com polímero hidroxietilcelulose

F1BNZ<sub>PEG</sub> = Comprimidos preparados com microcristais de BNZ produzidos com polímero polietilenoglicol

F2BNZ<sub>HEC</sub> = Comprimidos preparados com microcristais de BNZ produzidos com polímero hidroxietilcelulose e lauril sulfato de sódio

F2BNZ<sub>PEG</sub> = Comprimidos preparados com microcristais de BNZ produzidos com polímero polietilenoglicol lauril sulfato de sódio

FTIR = *Fourier transform infrared spectroscopy*

HC = Hemocultura

HPMC = Hidroxipropilmetilcelulose



HP $\beta$ CD = hidroxil-propil- $\beta$ -ciclodextrina

LD = Limite de detecção

LIT = *Liver Infusion Triptose*

LQ = Limite de quantificação

ME = Mistura efervescente

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

MF = Mistura física (1:1)

OECD = *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OPS = Organização Pan-Americana de Saúde

PCR = *Polymerase chain reaction*

PE = Protocolo de estudo

PEG = Polietilenoglicol 4000

PI = Precisão intermediária

pKa = Constante de ionização

PM = Peso molecular

RI = Repetibilidade instrumental

RM = Repetibilidade do método

RM $\beta$ CD = metil- $\beta$ -ciclodextrina randomizada

SCB = Sistema de Classificação Biofarmacêutica

UR = Umidade relativa

UV/Vis = Espectroscopia no ultravioleta /visível

VID = Velocidade intrínseca de dissolução

WHO = *World Health Organization*

$\alpha$ CD =  $\alpha$ -ciclodextrina

$\beta$ CD =  $\beta$ -ciclodextrina

$\gamma$ CD =  $\gamma$ -ciclodextrina

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
1. Doença de Chagas: uma doença negligenciada.....	23
2. Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
3. Manifestações Clínicas da doença de Chagas .....	26
4. Benznidazol e o tratamento etiológico da doença de Chagas.....	27
5. Estratégias de hidrossolubilização para o fármaco benznidazol .....	29
6. Estudos de Pré-Formulação.....	32
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>34</b>
<b>PARTE 1: <i>Estudos de Pré-formulação</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>Capítulo 1: Validação do método analítico por espectroscopia UV/Vis para doseamento do benznidazol .....</b>	<b>36</b>
1.1. INTRODUÇÃO .....	36
1.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
1.2.1. Materiais .....	37
1.2.2. Otimização do método analítico espectrofotométrico .....	37
1.2.3. Descrição do método analítico .....	37
1.2.4. Determinação da robustez .....	37
1.2.5. Determinação da seletividade.....	38
1.2.6. Determinação da linearidade .....	38
1.2.7. Determinação da exatidão .....	38
1.2.8. Determinação precisão .....	39
1.2.9. Determinação dos limites de quantificação e de detecção.....	39

---

1.2.10. Análise dos resultados .....	40
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
1.3.1. Robustez do método .....	40
1.3.2. Seletividade do método .....	41
1.3.3. Linearidade do método .....	42
1.3.4. Exatidão do método .....	42
1.3.5. Precisão do método .....	43
1.3.6. Limite de detecção e Limite de quantificação do método .....	44
1.4. CONCLUSÃO .....	44
<b>Capítulo 2: Caracterização físico-química do fármaco benznidazol .....</b>	<b>45</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	45
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
2.2.1. Materiais .....	46
2.2.2. Ensaio de solubilidade .....	46
2.2.3. Velocidade intrínseca de dissolução .....	47
2.2.4. Determinação do coeficiente de partição .....	47
2.2.5. Determinação do perfil térmico .....	48
2.2.6. Determinação do perfil difratométrico .....	48
2.2.7. Determinação da superfície específica .....	49
2.2.8. Determinação da densidade real .....	49
2.2.9. Análise morfológica e granulométrica .....	49
2.2.10. Medidas reológicas .....	49
2.2.11. Estudos de higroscopicidade .....	50
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
2.3.1. Ensaio de Solubilidade .....	51
2.3.2. Velocidade intrínseca de dissolução .....	53
2.3.3. Coeficiente de partição do benznidazol .....	54
2.3.4. Perfil térmico do benznidazol .....	55
2.3.5. Perfil difratométrico do benznidazol .....	56
2.3.6. Superfície específica do benznidazol .....	57
2.3.7. Densidade real do benznidazol .....	57
2.3.8. Morfologia e granulometria das partículas de benznidazol .....	58
2.3.9. Medidas reológicas .....	59
2.3.10. Estudos de higroscopicidade .....	60
2.4. CONCLUSÃO .....	61
<b>Capítulo 3: Estudo de polimorfismo cristalino e de compatibilidade térmica fármaco- excipiente .....</b>	<b>62</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	62
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	63
3.2.1. Materiais .....	63
3.2.2. Estudo de polimorfismo cristalino .....	64
3.2.3. Estudos de compatibilidade térmica fármaco-excipiente .....	66
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
3.3.1. Estudo de polimorfismo cristalino .....	67

---

3.3.2. Estudos de compatibilidade térmica fármaco-excipiente .....	73
3.4. CONCLUSÃO .....	77
<b>PARTE 2: Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas a base de microcristais hidrossolúveis de benznidazol .....</b>	<b>79</b>
<b>Capítulo 4: Micronização do benznidazol pela técnica de recristalização por mudança de solvente .....</b>	<b>80</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	80
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	80
4.2.1. Materiais .....	80
4.2.2. Obtenção de microcristais hidrossolúveis a base de benznidazol.....	81
4.2.3. Obtenção dos comprimidos a base de microcristais de benznidazol .....	86
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
4.3.1. Obtenção de microcristais hidrossolúveis de benznidazol.....	89
4.3.2. Obtenção dos comprimidos convencionais a base de microcristais de benznidazol.....	99
4.4. CONCLUSÃO .....	104
<b>Capítulo 5: Desenvolvimento de comprimidos efervescentes de benznidazol utilizando complexos de inclusão com ciclodextrinas .....</b>	<b>105</b>
5.1. INTRODUÇÃO .....	105
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	106
5.2.1. Materiais .....	106
5.2.2. Seleção da variedade de ciclodextrina utilizada no estudo.....	106
5.2.3. Obtenção dos complexos de inclusão .....	107
5.2.4. Preparação dos granulados efervescentes .....	107
5.2.5. Planejamento experimental - Desenho fatorial.....	107
5.2.6. Desenvolvimento de comprimidos efervescentes.....	108
5.2.7. Ensaio de caracterização físico-química dos complexos de inclusão e dos comprimidos efervescentes .	109
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	111
5.4. CONCLUSÃO .....	121
<b>PARTE 3: Estudos in vivo .....</b>	<b>123</b>
<b>Capítulo 6: Avaliação da eficácia dos comprimidos de benznidazol, desenvolvidos pela técnica de recristalização por mudança de solvente, no tratamento da doença de Chagas experimental.....</b>	<b>124</b>
6.1. INTRODUÇÃO .....	124
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	125
6.2.1. Modelo animal.....	125
6.2.2. Tratamento.....	125
6.2.3. Protocolos de estudo.....	125
6.2.4. Testes parasitológicos.....	127
6.2.5. Análise estatística dos dados .....	129

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	129
6.3.1. Protocolo Experimental 1 .....	129
6.3.2. Protocolo Experimental 2 .....	132
6.4. CONCLUSÃO .....	135
<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>136</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>149</b>
<b>Artigos publicados .....</b>	<b>149</b>
<b>Artigo aceito para publicação.....</b>	<b>149</b>
<b>Resumos publicados em anais de congressos .....</b>	<b>149</b>

## INTRODUÇÃO

Uma das doenças negligenciadas de grande relevância na América Latina é a doença de Chagas, que atinge cerca de 15 milhões de pessoas, gerando perda de população economicamente ativa, devido a sua condição de doença incapacitante e ao alto índice de mortalidade prematura observado. A doença de Chagas tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, e sua principal via de contaminação é a vetorial, sendo transmitida por insetos conhecidos popularmente pelo nome de barbeiros.

Apesar de ter sido descoberta há 100 anos, a doença de Chagas não tem um tratamento eficaz para as duas fases clínicas que apresenta e o único recurso terapêutico disponível no Brasil para combater essa grave doença é o fármaco benznidazol [BNZ].

Estudos mostram que apesar de sua efetividade pré-clínica, o tratamento com o BNZ revela resultados questionáveis, principalmente em relação à eficácia desse tratamento entre os indivíduos chagásicos. Sua efetividade tem sido relatada na fase aguda da doença, porém o mesmo não ocorre com a fase crônica. Dentre as causas desse problema podem-se citar as variações na susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* ao fármaco, e às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do BNZ, como a meia-vida relativamente curta e a limitada penetração tecidual (URBINA, 2009).

As diferenças de efetividade do BNZ na fase aguda e crônica ainda não estão totalmente claras, e além desses aspectos, a maior limitação do uso do BNZ é a sua baixa solubilidade aquosa e errática biodisponibilidade, um fator que condiciona sua reduzida absorção gastrointestinal e a necessidade de se administrar elevadas doses de fármaco para que as respostas terapêuticas desejáveis sejam atingidas. Essas altas doses administradas são a causa de importantes efeitos colaterais que levam ao abandono da terapêutica, especialmente na fase crônica da doença.

Apesar dos impactos socioeconômicos causados pela doença de Chagas e da sua grande importância epidemiológica, destacada pela sua expansão para várias regiões do mundo, ela ainda constitui um problema que afeta principalmente a população de mais baixa renda da América Latina. Por isso, nenhuma atenção das indústrias farmacêuticas é voltada para pesquisa de novos tratamentos para essa doença. Além disso, novas formulações que melhorassem a biodisponibilidade e eficácia do BNZ foram desenvolvidas em escassos trabalhos, mas que não demonstraram sucesso *in vivo*. O que explicita a necessidade de

estudos para desenvolvimento de novos medicamentos que atendam a demanda da terapêutica da doença de Chagas.

Desse modo, este trabalho propôs-se a desenvolver alternativas para melhorar as características farmacocinéticas e o processamento tecnológico do BNZ, capazes de favorecer sua solubilidade e permitir sua incorporação em sistemas terapêuticos mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Doença de Chagas: uma doença negligenciada

Doenças infecciosas tropicais como a doença de Chagas, leishmaniose e a tripanossomíase africana ainda são responsáveis por significativa mortalidade e morbidade, principalmente nos países menos desenvolvidos, apesar das inovações da ciência no manejo de tais doenças e dos processos avançados de desenvolvimento de novos fármacos (HOTEZ et al., 2007).

Este fato pode ser elucidado se o impacto da globalização nos países pobres for levado em consideração. A globalização provoca um crescimento econômico desigual entre os países e os seus condicionantes têm conseqüências graves nas políticas públicas de saúde (BEYRER et al., 2007; DIAS, 2007). Além disso, as doenças tropicais vêm se tornando progressivamente negligenciadas principalmente porque elas não oferecem retorno financeiro suficiente para a indústria farmacêutica dedicar-se à pesquisa e ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos (PÉCOUL, 2004; TROUILLER et al., 2002).

Uma dessas doenças negligenciadas de grande relevância, seja por seus aspectos históricos ou por seus impactos sociais, é a doença de Chagas, responsável por 15 milhões de pessoas infectados na América Latina e com mais de 28 milhões de pessoas sob risco de contaminação em 21 países endêmicos. Estima-se ainda, que a incidência anual de novos casos seja, em média, em torno de 41 mil novos casos (WHO, 2007).

Assim, o número de vidas afetadas, a condição de doença incapacitante, a mortalidade prematura são aspectos importantes que causam perda de população economicamente ativa, o que prejudica o crescimento econômico e a prosperidade dos países afetados, contribuindo para o fechamento do ciclo da pobreza.

### 2. Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, cujos membros apresentam uma organela denominada cinetoplasto. O médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, em 1908, foi o primeiro a encontrar o *T. cruzi* no intestino de insetos, que se alojavam em casas de pau-a-pique da localidade de Lassance em Minas Gerais, Brasil. Carlos *Flávia Pires Maximiano*



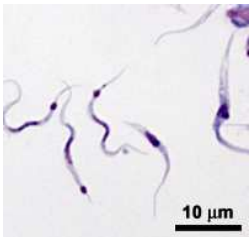
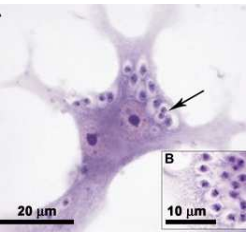
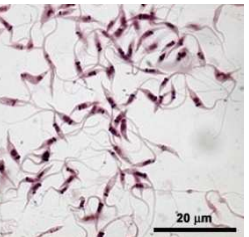
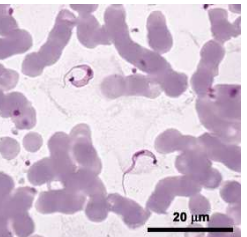
Chagas diagnosticou o primeiro caso humano de tripanossomíase americana durante a fase aguda da infecção em uma criança de 2 anos, Berenice, e estudou a patogênese desse novo parasita em animais de experimentação (CHAGAS, 1909).

De acordo com os achados de Carlos Chagas, a contaminação pelo *T. cruzi* ocorria através da picada de insetos, configurando a via de transmissão vetorial, cujos vetores do *T. cruzi* são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, da família Reduviidae e subfamília Triatominae. Existem mais de 130 espécies conhecidas, no entanto, somente poucas espécies pertencentes aos três gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* têm importância destacada como vetores do *T. cruzi* entre seres humanos e animais domésticos (WHO, 2002).

No Brasil, existem pelo menos 44 espécies de vetores, destas, apenas cinco são consideradas domésticas e, portanto, de maior importância epidemiológica: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sórdida* (COURA, 2003). Os triatomíneos são conhecidos popularmente pelo nome de barbeiro, fincão, chupança, percevejos e baratas-d'água (DANTAS et al., 2006).

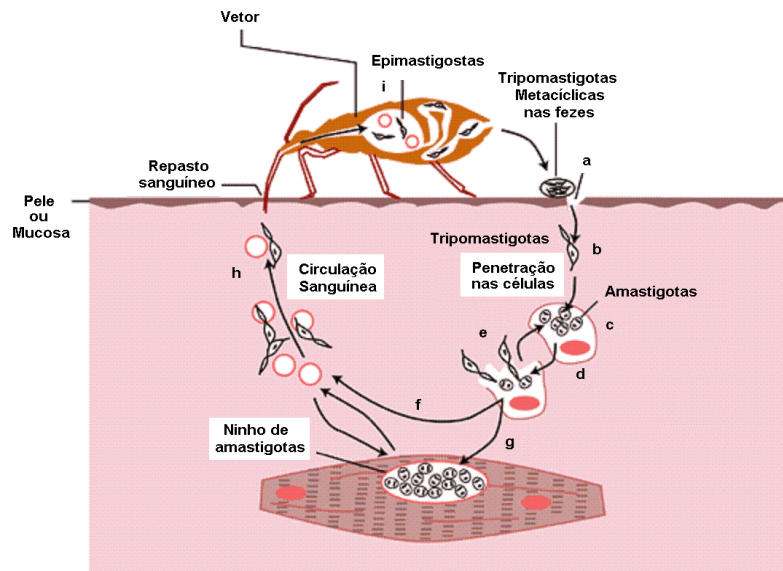
O ciclo evolutivo do *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas diferentes, identificadas com base na forma geral da célula e na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (BRENER et al., 2000; SOUZA, 2009). As principais diferenças encontram-se descritas na tabela 1, a seguir.

**Tabela 1: Diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.**

Forma evolutiva	Tripomastigotas metacíclicas	Amastigotas	Epimastigotas	Tripomastigotas sanguíneas
Encontrada no:	Inseto vetor	Interior de células do hospedeiro vertebrado ou em cultura de células	Tubo digestivo do inseto vetor e cultivo axênico	Sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado e no cultivo de células
Morfologia da célula	Alongada	Esférica	Alongada	Alongada
Posição do cinetoplasto	Posterior ao núcleo	Próximo ao núcleo	Próximo ao núcleo	Posterior ao núcleo
Observação por microscopia óptica <sup>a</sup>				

Fonte: <sup>a</sup> FIOCRUZ, 2009. Elaboração própria (BRENER et al., 2000).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* abrange duas fases: parte do ciclo ocorre nos insetos vetores, chamados de hospedeiros invertebrados, e a outra parte ocorre no hospedeiro vertebrado, ou seja, seres humanos e outras espécies de mamíferos (Figura 1).



**Figura 1: Representação esquemática do ciclo evolutivo do *T. cruzi*.** (a) Durante o repasto sanguíneo, o inseto defeca sobre a pele ou mucosa. (b) O protozoário nas fezes, na forma de tripomastigotas metacíclicas, penetra o hospedeiro vertebrado quando há atrito na pele ou contato com a mucosa. (c) Nas células do hospedeiro, os tripomastigotas se transformam em amastigotas. (d) Quando as células se rompem, liberam tripomastigotas que (e) podem infectar novas células, (f) permanecer na corrente sanguínea ou (g) parasitar músculos e tecido nervoso, na forma de amastigotas (ninhos). (h) Novos vetores são infectados durante o repasto sanguíneo por ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas. (i) No tubo digestivo do inseto, essas tripomastigotas se transformam em epimastigotas; na porção posterior do tubo, estas formas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas, formas infectivas, completando assim o ciclo de vida do protozoário (adaptado de MACEDO et al., 2002).

O ciclo no hospedeiro invertebrado inicia-se com a ingestão das formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto sanguíneo do inseto. No tubo digestivo, estas formas se diferenciam em formas epimastigotas, que atingem o intestino médio e multiplicam-se por divisão binária. Em seguida, estas formas migram para a porção posterior do tubo digestivo do triatomíneo dando início ao processo de metaciclogênese do parasito, fenômeno que ocorre em resposta a estímulos como a presença de enzimas digestivas no ambiente intestinal dos triatomíneos (GARCIA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2009). Ao final desse processo, as formas tripomastigotas metacíclicas estão desenvolvidas e são as formas infectantes para hospedeiros vertebrados.

O inseto vetor que alberga as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, ao picar o hospedeiro vertebrado, ingere grande quantidade de sangue acompanhada por rápida diurese e liberação dos parasitos juntos com as fezes. A infecção acontece por penetração das formas tripomastigotas metacíclicas depositadas pelo triatomíneo sobre a pele lesada ou através da penetração das formas infectantes através da pele ou mucosa íntegra do hospedeiro (ANDRADE; ANDREWS, 2005; BRENER, 1973).

Após a penetração, as tripomastigotas metacíclicas invadem a célula hospedeira e iniciam um ciclo de multiplicação seguido pela disseminação das formas tripomastigotas sanguíneas para novas células. No citoplasma destas células, se diferenciam em formas amastigotas que se multiplicam e se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas. Em seguida, estas últimas são liberadas por ruptura celular e alcançam o sistema circulatório, podendo infectar qualquer célula nucleada ou reiniciar o ciclo de infecção, se forem ingeridas por um novo inseto vetor (ANDRADE; ANDREWS, 2005; BRENER, 1973).

Além da via de transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser transmitida por vias não vetoriais, como transfusões sanguíneas (SCHMUNIS, 1999), transmissão congênita (TORRICO et al., 2004), transplantes de órgãos (ALTCLAS et al., 2005) e por via oral através da ingestão de alimentos contaminados, dentre outras (DIAS, 2006; NÓBREGA et al., 2009).

### **3. Manifestações Clínicas da doença de Chagas**

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda inicia-se com as manifestações clínicas de sinais de entrada do parasita no organismo, e pode persistir por 2 meses, apresenta-se sintomática ou assintomática dependendo do estado imunológico do indivíduo. Dentre os sinais de porta de entrada, o sinal de Romaña e chagoma de inoculação podem oferecer indícios fortes de infecção por *T. cruzi*. O sinal de Romaña apresenta-se como uma inflamação na região ocular, caracterizado por edema bipalpebral e unilateral. Ao passo que o chagoma de inoculação mostra-se como uma erupção cutânea provocada pela reação imune a picada do vetor e a introdução das formas infectantes (BARRETT et al., 2003).

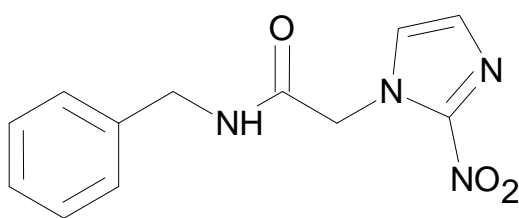
Em crianças e pacientes imunodeprimidos, a fase aguda sintomática muitas vezes pode ser fatal, devido a casos de meningo-encefalite e, mais raramente a miocardite aguda

difusa. Os principais sintomas dessa fase são febre, edema, poliadenia, complicações cardíacas, hepato-esplenomegalia e perturbações neurológicas (LANA; TAFURI, 2002).

Após a fase aguda, aqueles indivíduos que sobrevivem evoluem para a fase crônica, que na maioria dos casos, é assintomática e por isso, denominada forma indeterminada e podem permanecer assim indefinidamente. Entretanto, depois de muitos anos nessa fase, os pacientes podem desenvolver sintomatologia relacionada ao sistema cardiovascular ou digestivo e, em muitos casos podem desenvolver patologias que comprometam ambos os sistemas, caracterizando as formas cardíaca e digestiva da doença de Chagas crônica (GUEDES, 2009).

#### 4. Benznidazol e o tratamento etiológico da doença de Chagas

Apesar de ter sido descoberta há mais de 100 anos, a doença de Chagas não tem um tratamento eficaz para suas duas fases clínicas (CALDAS et al., 2008; TOLEDO et al., 2003). O único fármaco disponível no mercado brasileiro é o benznidazol [BNZ] (Figura 2), produzido e comercializado atualmente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco [LAFEPE], após os direitos de patente e tecnologia terem sido cedidos ao governo brasileiro pelo grupo suíço Roche® em 2003 (BRASIL, 2003; LEITE, 2007).



*N*-benzyl-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)acetamide

**Figura 2: Fórmula estrutural do benznidazol**

O BNZ [N-benzyl-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)acetamide] está disponível na forma de comprimidos de 100mg e seu esquema terapêutico corresponde a doses diárias de 5 a 7,5mg/Kg de peso corpóreo, fracionadas em duas ou três administrações, sendo o período de tratamento habitual de 30 a 60 dias (OPS, 1998).

Sua efetividade tem sido relatada na fase aguda da doença, porém o mesmo não ocorre com a fase crônica (CALDAS et al. 2008a; URBINA, 2003; CANÇADO, 2002). As

diferenças de eficácia do BNZ na fase aguda e crônica ainda não estão totalmente claras, mas alguns pesquisadores sugerem que podem estar relacionadas às propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis do fármaco (LAMAS et al., 2006).

A farmacocinética do BNZ é um reflexo da sua baixa solubilidade em água (LEONARDI et al., 2009), um fator que condiciona sua reduzida absorção gastrointestinal e a necessidade de se administrar elevadas doses de fármaco para que as respostas terapêuticas desejáveis sejam atingidas (LAMAS et al., 2006).

Outro fator crítico na terapêutica com o BNZ é a presença de muitos efeitos adversos decorrentes das altas doses administradas. Muitos desses efeitos, como vômitos, polineuropatia, dermatite e depressão da medula óssea, aliados ao elevado número de comprimidos ingeridos diariamente, conduzem o paciente à interrupção do tratamento medicamentoso (CANÇADO, 2002; COURA; CASTRO, 2002).

Apesar de sua importância social e clínica, e dos numerosos estudos em diferentes áreas de conhecimento que envolve a patologia da doença de Chagas, escassos trabalhos científicos tentaram desenvolver novas formulações que melhorassem a biodisponibilidade e a eficácia do BNZ.

Morilla e colaboradores (2004) desenvolveram lipossomas a base de BNZ para administração parenteral do fármaco, e apesar de conseguirem um bom direcionamento dos lipossomas para o fígado, os testes *in vivo*, não comprovaram uma melhora na terapêutica com essas formulações (MORILLA et al., 2004). Lamas e colaboradores (2006) desenvolveram formulações líquidas, também para administração parenteral do BNZ, utilizando co-solventes para alcançar uma solubilidade satisfatória do fármaco, no entanto, ensaios *in vivo* são necessários para comprovar a eficácia dessas formulações (LAMAS et al., 2006).

Recentemente foram desenvolvidos complexos de BNZ com rutênio com resultados bastante promissores. Um incremento significativo na solubilidade do fármaco foi conseguido, acompanhado de melhorias na efetividade terapêutica e redução da toxicidade (SILVA et al., 2008). Outro estudo recente relata a incorporação de BNZ a micropartículas de quitosana conferindo melhoras nas propriedades de dissolução do fármaco (LEONARDI et al., 2009).

## 5. Estratégias de hidrossolubilização para o fármaco benznidazol

Nos últimos 30 anos nenhum agente terapêutico antichagásico descoberto mostrou-se melhor que a quimioterapia já disponível (COURA; CASTRO, 2002). Neste contexto, investimentos no desenvolvimento de novas formulações contendo o BNZ constituem uma das estratégias mais coerentes de combate à doença de Chagas. O insucesso da terapêutica tradicional pode ser atribuído às características físico-químicas do BNZ, como sua reduzida solubilidade aquosa e permeabilidade, o que contrasta com a sua poderosa ação farmacológica contra o agente etiológico da doença.

Durante este trabalho foram adotadas algumas estratégias visando minimizar as dificuldades farmacotécnicas relacionadas ao BNZ, focando o desenvolvimento de formulações sólidas, como comprimidos e cápsulas, formas farmacêuticas de administração oral que são facilmente manipuladas pelo paciente, sendo mais adequadas para a auto-administração, conferindo-lhe segurança e conforto (ALLEN Jr; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Uma dessas estratégias é a redução do tamanho de partícula dos fármacos, uma maneira simples de aumentar sua velocidade de dissolução, e com isso sua biodisponibilidade. Vários são os métodos de redução de tamanhos de partículas disponíveis, entre os mais utilizados estão os métodos físicos de pulverização mecânica em moinhos e almofarizes.

O processo de pulverização de sólidos de forma mecânica eleva a energia termodinâmica residual na superfície das partículas, afetando suas propriedades físico-químicas, como estabilidade, capacidade de fluxo, umectabilidade e compressibilidade. As frações amorfas de materiais pulverizados, além de representarem um elevado risco de degradação devido a sua maior reatividade química, apresentam elevada carga eletrostática que dificulta sua manipulação devido à elevada tendência à aglomeração. Devido à abrasão com as superfícies metálicas dos equipamentos de pulverização, impurezas metálicas podem ser incorporadas ao material sólido e comprometer sua estabilidade química, devido à ação catalítica desta contaminação. Outra importante desvantagem para essa técnica é a tendência das partículas pequenas de sofrerem crescimento cristalino (RASENACK et al., 2003; RASENACK et al., 2004).

Novas técnicas que consigam produzir diretamente fármacos em tamanho de partícula reduzido podem resolver a maioria dos problemas anteriormente citados. Procedimentos de recristalização espontânea do princípio ativo estabilizado por agentes hidrofílicos, em escala nanoparticular ou microparticular, têm sido utilizados recentemente

com resultados bastante promissores (CUNHA-FILHO et al., 2008; SARKARI et al., 2002). Essa técnica tem permitido obter materiais com tamanhos de partículas bastante reduzidos, homogêneos e de baixa coesividade conseguindo importantes incrementos na velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis em água, como o ibuprofeno, o cetoconazol e o itraconazol (RASENACK; MÜLLER, 2002).

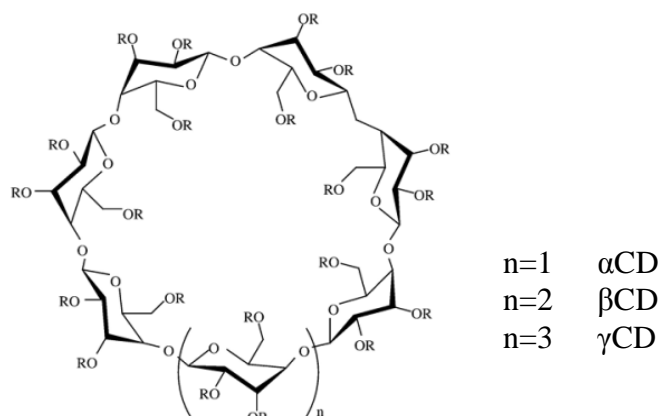
O fármaco antitumoral  $\beta$ -lapachona é outro exemplo de substância muito pouco solúvel em água e muito instável em solução que teve sua velocidade de dissolução incrementada pelo uso da técnica recristalização por mudança de solvente. Com esta técnica, Cunha-Filho e colaboradores (2008) obtiveram partículas muito pequenas ( $\sim 3\mu\text{m}$ ) utilizando hidroxipropilmetilcelulose [HPMC] como agente estabilizante. As partículas de  $\beta$ -lapachona e HPMC mostraram um aumento na velocidade de dissolução do fármaco, o que pode ser atribuído à grande redução do tamanho de partícula e a um elevado incremento na área superficial do fármaco (CUNHA-FILHO et al., 2008).

No exemplo do antidiabético glicazida, Varshosaz e colaboradores (2008) conseguiram partículas cinquenta vezes menores que os cristais do fármaco não tratados por técnicas de precipitação espontânea, usando a HPMC. Os microcristais proporcionaram uma eficiência de dissolução da glicazida quatro vezes maior quando comparados com a dissolução do fármaco original, mostrando que o emprego a técnica de recristalização por mudança de solvente usando agente estabilizante produz microcristais com alta velocidade de dissolução do fármaco (VARSHOSAZ et al., 2008).

Steckel e colaboradores (2003) também usaram a HPMC para obter microcristais de fármacos usados como pós inalatórios. Neste caso, o tamanho reduzido das partículas condiciona uma boa absorção pelo trato respiratório, e com isso garante a eficácia da terapêutica desses fármacos. Os resultados obtidos utilizando procedimentos de recristalização do fármaco estabilizado por agentes hidrofílicos mostraram-se bastante promissores para administração pulmonar, pois partículas com tamanho entre 2 e  $3,5\mu\text{m}$  foram obtidos (STECKEL et al., 2003; STECKEL et al., 2003a).

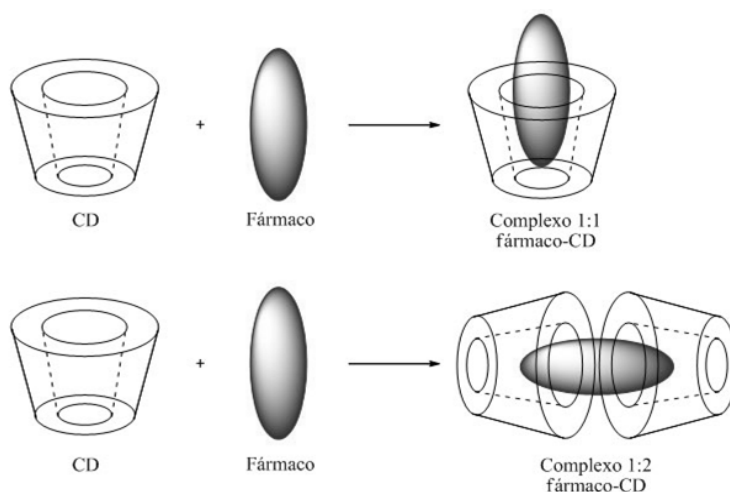
A formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas [CD] também é uma alternativa para melhorar a solubilidade de fármacos muito pouco solúveis em água, como o BNZ. As ciclodextrinas são amplamente empregadas em diversas áreas como a alimentícia, cosmética, analítica e, recentemente, são descritas como uma nova classe de excipientes farmacêuticos (LOFTSSON, 2007; VENTURINI et al., 2008). As CD são formadas por unidades de D-glicopirranose, que juntas originam estruturas cíclicas com a forma espacial

tronco-cônica (Figura 3 e 4). É justamente essa configuração espacial, com grupos hidroxilas voltados para o exterior, que confere características físico-químicas peculiares às CD, as quais são exploradas no campo farmacêutico (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).



**Figura 3: Estrutura molecular dos três tipos de ciclodextrinas,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .** Adaptado de Brewster; Loftsson, 2007.

A capacidade das CD de solubilizar-se em água e ao mesmo tempo incorporar, no interior da sua cavidade, moléculas hidrofóbicas confere aos complexos formados propriedades físico-químicas diferentes das propriedades dos seus produtos de origem. Essa encapsulação de fármacos proporciona importantes incrementos na biodisponibilidade e estabilidade de inúmeras formas farmacêuticas atualmente comercializadas (SÁ-BARRETO; CUNHA-FILHO, 2008).



**Figura 4: Formação de complexos fármaco-CD com estequiometria 1:1 e 1:2.** Adaptado de Davis; Brewster, 2004.



Neste contexto, várias alternativas tecnológicas podem ser utilizadas para melhorar as características de solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, e assim, incrementar sua biodisponibilidade (ROGERS, 2002). No caso específico do BNZ, parte dos problemas de biodisponibilidade, citados anteriormente, poderia ser resolvida pela produção de partículas em tamanho reduzido por novas técnicas de hidrossolubilização. Entretanto, poucas são as informações sobre as características físico-químicas do BNZ em compêndios oficiais e na literatura científica. Essas informações seriam úteis para a inclusão do BNZ em sistemas hidrossolubilizados e posterior desenvolvimento de novas formulações sólidas que contenham o BNZ.

### **6. Estudos de Pré-Formulação**

Para se desenvolver qualquer forma farmacêutica sólida, como cápsulas e comprimidos, é essencial que certas propriedades físicas e químicas fundamentais da molécula e outras propriedades derivadas do fármaco em pó sejam conhecidas. Estas informações são obtidas em estudos de pré-formulação. Estes estudos quando adequadamente conduzidos, desempenham um papel fundamental na previsão de problemas com a formulação, indicando os passos corretos para a produção das diversas formas farmacêuticas (ALLEN Jr; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005).

O conhecimento de certas propriedades físico-químicas do princípio ativo, como solubilidade, tamanho e área superficial de partícula, presença de formas polimórficas, velocidade de dissolução, coeficiente de partição, pKa, propriedades reológicas e compatibilidade do fármaco com outros adjuvantes, exercem uma importante influencia sobre a biodisponibilidade e a estabilidade do fármaco e permitem nortear a seleção de adjuvantes que se ajustam a formulação pretendida (ALLEN, 2008).

O procedimento clássico empregado na avaliação de compatibilidade fármaco-excipiente envolve a preparação de uma amostra sólida contendo uma mistura destes componentes. Essa amostra é estocada a elevadas temperaturas durante vários meses e depois, é analisada sistematicamente usando um método indicativo de estabilidade adequado. Esse procedimento consome tempo e em geral, detecta somente instabilidades químicas (NUNES et al., 2009).

Os recentes estudos de compatibilidade que utilizam a análise térmica como ferramenta, destacam a sua vantagem em disponibilizar rapidamente o conhecimento de

quaisquer interações físicas e/ou químicas entre o fármaco e os excipientes que possam dar origem a mudanças na natureza química, na estabilidade, na solubilidade, na absorção e na resposta terapêutica do fármaco (BERTOL et al., 2009; CUNHA-FILHO et al., 2007a; STULZER et al., 2008).

Em particular, a calorimetria exploratória diferencial [DSC] tem sido considerada a técnica de escolha para pesquisa inicial de interações entre fármaco-excipiente. Utilizando apenas alguns miligramas de amostra, o DSC fornece importantes informações sobre as propriedades físicas, comportamento cinético de degradação, formas polimórficas (KISS et al., 2006; MURA et al., 2002; NUNES et al., 2009) e estabilidade de materiais durante processamento e estocagem (MISRA et al., 2007; MORA et al., 2006).

A avaliação físico-química de interações entre ativos e excipientes de uma formulação é realizada, em geral, através da comparação de curvas térmicas das substâncias puras com as curvas obtidas a partir da mistura fármaco-excipiente na proporção 1:1 (p/p) (STULZER et al., 2008a; BRUNI et al., 2009).

Sendo assim, fica evidente a necessidade de se realizar estudos para o aprimoramento do processamento tecnológico do fármaco BNZ, através de técnicas capazes de corrigir suas deficiências de solubilidade e que permitam incluí-lo em formulações melhores estruturadas que atendam a demanda terapêutica da doença de Chagas.

### OBJETIVO GERAL

Realizar estudos de pré-formulação com o benznidazol e desenvolver formulações sólidas a base deste fármaco utilizando técnicas de hidrossolubilização que permitam melhorar seu perfil de dissolução. Avaliar as formulações desenvolvidas utilizando modelo experimental murino para doença de Chagas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma caracterização farmacotécnica do benznidazol através do estudo de suas propriedades reológicas, morfológicas e de distribuição do tamanho de partículas;
- Realizar uma caracterização físico-química do benznidazol determinando algumas propriedades até então desconhecidas dessa molécula como coeficiente de partição, superfície específica, existência de polimorfismo, higroscopicidade e solubilidade intrínseca;
- Realizar estudos de compatibilidade do benznidazol com os excipientes a serem usados para o desenvolvimento das formulações sólidas;
- Desenvolver estratégias de hidrossolubilização do benznidazol, utilizando procedimentos farmacotécnicos capazes de incrementar o perfil de dissolução desse fármaco;
- Desenvolver formulações sólidas a base dos microcristais hidrossolúveis de benznidazol;
- Selecionar as formulações mais promissoras de BNZ para avaliação biológica utilizando modelos animais.
- Proceder à avaliação biológica das formulações selecionadas utilizando modelo murino infectado com a cepa Y de *T. cruzi*.

**PARTE 1:**

*Estudos de Pré-formulação*

---

---

---

## Capítulo 1: Validação do método analítico por espectroscopia UV/Vis para doseamento do benznidazol

### 1.1. INTRODUÇÃO

A combinação de vários fatores durante o desenvolvimento, a produção, a avaliação e o uso dos medicamentos garantem a qualidade final do produto farmacêutico. Um desses fatores importantes está relacionado aos resultados analíticos obtidos durante as diversas etapas do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, uma vez que dados analíticos incertos podem gerar prejuízos à saúde de muitos pacientes e gastos financeiros para as indústrias farmacêuticas (RIBANI et al., 2004).

A garantia de que a qualidade dos produtos está sendo atingida envolve o estudo progressivo durante o desenvolvimento de metodologias analíticas para a quantificação de fármacos em formas farmacêuticas e a validação dessas metodologias, para que dúvidas em relação aos resultados analíticos fornecidos pelo método sejam completamente eliminadas (BRITO et al., 2003).

A validação analítica abrange o processo de comprovação de que a metodologia analítica desenvolvida é apropriada e fornecerá dados confiáveis para o estudo ao qual se destina. Portanto, a validação é o estabelecimento de evidências experimentais documentadas que garantem que um método produzirá dados consistentes, reprodutíveis e que atenderão os critérios de qualidade especificados (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros analíticos avaliados durante a validação de um método são: robustez, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Os protocolos de ensaio estão descritos por diferentes órgãos regulatórios nacionais e internacionais (ICH Q2(R1), 2005; ANVISA, 2003; THOMPSON et al., 2002).

Essa etapa do estudo foi conduzida segundo a regulamentação RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] (ANVISA, 2003). Utilizou-se técnica instrumental de absorção molecular, espectrofotometria UV/Vis, adaptando a metodologia analítica disponível na literatura. O objetivo foi obter uma metodologia simples, de baixo custo e que proporcionasse resultados confiáveis de doseamento do benznidazol para utilização nas etapas subsequentes do trabalho.

## 1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.2.1. Materiais

Utilizou-se durante toda a validação do método, o benznidazol [BNZ] lote 13871 produzido pelos laboratórios Roche, com pureza igual a 99,4%. Os excipientes foram: Hidroxipropilmetilcelulose Methocel<sup>®</sup> F50 Premium LV [HPMC<sub>F50</sub>]; Methocel<sup>®</sup> K100 Premium LV [HPMC<sub>K100</sub>]; Etilcelulose Ethocel<sup>®</sup> Standard 45 Premium [EC<sub>45</sub>]; Ethocel<sup>®</sup> Standard 100 Premium [EC<sub>100</sub>] e o solvente metanol grau analítico Synth<sup>®</sup>.

### 1.2.2. Otimização do método analítico espectrofotométrico

O método empregado para a quantificação do BNZ baseou-se na metodologia proposta por Soares-Sobrinho e colaboradores (2006) com adaptações (SOARES-SOBRINHO et al., 2006). Procedeu-se uma validação completa do método, conforme preconizado na resolução nº 899/ANVISA e nas normas internacionais do ICH, prestando especial atenção na seletividade do método frente aos diferentes excipientes utilizados nas formulações durante este trabalho.

### 1.2.3. Descrição do método analítico

A solução estoque de BNZ foi preparada a partir de 25mg de fármaco dissolvidos em metanol em um balão volumétrico de 50mL empregando banho de ultrassom por 15 minutos. A partir dessa solução, foram feitas as diluições necessárias utilizando como solvente uma solução metanol/água 1:1, considerando a concentração nominal igual a 20µg/mL. As leituras das amostras foram realizadas em um espectrofotômetro UV/Vis, modelo Helios α (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>), no comprimento de onda de 324nm.

### 1.2.4. Determinação da robustez

A capacidade do método em resistir a modificações nas condições experimentais foi avaliada testando-se a influência da composição do solvente utilizado para diluição da solução estoque e o modo de leitura no espectrofotômetro.

Quanto ao solvente, foram medidas as absorvâncias das amostras na concentração nominal diluídas em metanol PA e em solução metanol:água (1:1). No que se refere ao modo de leitura do aparelho, as mesmas amostras na concentração nominal foram medidas na opção automática e na opção manual utilizando cubetas de quartzo. A robustez dessas variáveis foi avaliada em triplicata empregando Análise de Variância Simples [ANOVA].

### 1.2.5. Determinação da seletividade

A seletividade do método foi verificada comparando-se os valores de absorvância do BNZ na concentração nominal obtidos na presença e na ausência dos seguintes interferentes: polímeros hidrofílicos derivados de celulose: hidroxipropilmetilcelulose (HPMC<sub>F50</sub> e HPMC<sub>K100</sub>) e etilcelulose (EC<sub>45</sub> e EC<sub>100</sub>). As amostras foram analisadas em sextuplicata. A concentração dos polímeros foi estabelecida em 6µg/mL, o que corresponde a 30% da concentração nominal de fármaco. Os resultados da especificidade foram expressos em percentual de discrepância conforme equação abaixo.

$$D(\%) = \frac{(A_f - A_i)}{A_i} \quad \text{Equação (1.1)}$$

Onde,  $A_f$  é a absorvância do BNZ na presença do interferente e  $A_i$  corresponde à absorvância do BNZ na ausência de interferentes.

### 1.2.6. Determinação da linearidade

A linearidade do método foi obtida a partir de três curvas de calibração, analisando-se cinco pontos diferentes em um intervalo de 8 a 28µg/mL. A análise da regressão linear foi efetuada utilizando-se o método dos mínimos quadrados. Foi calculado o coeficiente angular da regressão linear [ $R^2$ ] e também a equação da reta de calibração.

### 1.2.7. Determinação da exatidão

A exatidão foi determinada a partir das absorvâncias das soluções de BNZ preparadas nas concentrações de 75, 100 e 125% em relação à concentração nominal, 20µg/mL, em triplicata. Os resultados foram calculados em porcentagem de recuperação com

relação ao resultado teórico e comparados através do teste *t*-Student. A equação usada para o cálculo da recuperação encontra-se descrita a seguir.

$$R(\%) = \frac{C_M}{C_T} \times 100 \quad \text{Equação (1.2)}$$

Onde, R é a porcentagem de recuperação,  $C_M$  é a concentração média e  $C_T$  a concentração teórica.

### 1.2.8. Determinação precisão

A precisão do método analítico foi avaliada em três níveis: repetibilidade instrumental [RI], repetibilidade do método [RM] e precisão intermediária [PI]. A RI foi estudada mediante dez leituras consecutivas da mesma amostra de BNZ na concentração nominal. A variabilidade instrumental foi determinada através do coeficiente de variação das respostas obtidas. A RM foi estimada avaliando-se seis amostras autênticas de mesma concentração, 20µg/mL, através de seus coeficientes de variação. A PI foi estudada por dois operadores, em diferentes dias e empregando distintas aparelhagens. As análises foram realizadas em triplicata e cada grupo de análise foi analisado através de ANOVA e os resultados expressos em relação ao coeficiente de variação [CV]. A equação utilizada para esse cálculo foi:

$$CV(\%) = \frac{DP}{C_M} \quad \text{Equação (1.3)}$$

Onde, CV indica o coeficiente de variação, DP o desvio padrão e  $C_M$  a concentração média.

### 1.2.9. Determinação dos limites de quantificação e de detecção

Os limites de quantificação [LQ] e de detecção [LD] do método foram estimados a partir do ruído de base, calculando-se o desvio padrão obtido das leituras consecutivas de dez brancos, solução metanol:água (1:1), e aplicando-se as equações abaixo.



$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad \text{Equação (1.4)}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Equação (1.5)}$$

Onde, DP corresponde ao desvio padrão, IC ao coeficiente angular da equação da curva de calibração, LD é o limite de detecção e LQ, limite de quantificação.

#### 1.2.10. Análise dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente segundo os parâmetros da ANVISA, RE nº 899 de 29 maio de 2003 (ANVISA, 2003).

### 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método analítico espectrofotométrico empregado no doseamento de BNZ baseou-se em metodologia descrita na literatura com algumas modificações (SOARES-SOBRINHO et al., 2006). Optou-se por utilizar o metanol como solvente, em lugar do etanol que apresenta menor capacidade de solubilização do fármaco e produziu resultados menos consistentes na preparação das soluções estoques. A escolha do comprimento de onda no ultravioleta de 324nm baseou-se no pico de máxima absorção encontrado em prévia varredura.

#### 1.3.1. Robustez do método

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, sendo sua execução recomendada pela ANVISA e pelo ICH, ainda na fase de desenvolvimento do método (ICH Q2(R1), 2005; ANVISA, 2003).

As modificações no solvente de diluição usado para a preparação da solução padrão não mostraram diferenças significativas nas leituras da absorbância das soluções de BNZ. Da mesma maneira, as leituras do espectrofotômetro em modo manual ou automático, não alteraram de forma importante os resultados (Tabela 1.1).

Estes resultados demonstram que o método proposto é bastante robusto quanto às variações metodológicas testadas.

**Tabela 1. 1: Dados de robustez do método analítico relativos à avaliação da composição do solvente no método e ao modo de leitura no espectrofotômetro.**

Parâmetros avaliados		Absorbâncias		
		1	2	3
Composição da solvente	Metanol (PA)	0,556	0,561	0,561
	Metanol:água (1:1)	0,557	0,561	0,562
Modo de leitura	Automático	0,557	0,561	0,562
	Manual	0,554	0,557	0,577

### 1.3.2. Seletividade do método

Seletividade pode ser definida como a habilidade do método em separar determinado fármaco de seus produtos de degradação, metabólitos, macromoléculas biológicas, excipientes e outros fármacos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010). Existe uma variedade de procedimentos para validar a seletividade de um método. Um teste simples é demonstrar a falta de resposta instrumental frente à presença de outras substâncias (RIBANI et al. 2004).

Com o objetivo de averiguar se há interferência dos excipientes no método proposto, foram selecionados alguns excipientes empregados nas formulações desenvolvidas nesta dissertação. Nenhum dos polímeros utilizados apresentou absorção significativa no comprimento de onda de máxima absorbância do BNZ, assim como não se observam modificações no espectro de absorção do fármaco em presença desses interferentes.

A tabela 1.2 revela que as discrepâncias encontradas apresentam um intervalo de valores entre -0,57 e 1,14%. A variação conseguida situou-se abaixo do limite recomendado de 2,0%, e pode ser atribuída ao erro aleatório, uma vez que não há diferença estatística entre os grupos de amostra contendo BNZ isolado e contendo BNZ acrescido de polímero. Portanto, com base nos parâmetros da legislação vigente, o método mostrou ser seletivo para o doseamento do BNZ (CUADRADO et al., 2001).

**Tabela 1. 2: Dados de especificidade do método analítico.**

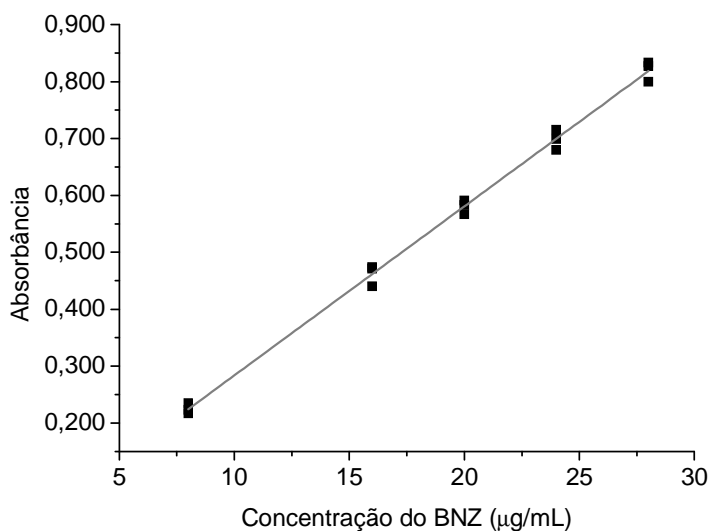
Solução	Absorbância	DP <sup>a</sup>	Discrepância (%)
BNZ	0,526	(0,005)	-
BNZ + HPMC <sub>F50</sub>	0,523	(0,004)	-0,57
BNZ + HPMC <sub>K100</sub>	0,523	(0,002)	-0,57
BNZ + EC <sub>45</sub>	0,532	(0,006)	+1,14
BNZ + EC <sub>100</sub>	0,527	(0,005)	+0,19

<sup>a</sup>Dados representados como a média e o desvio padrão (entre parênteses) dos resultados, n= 6.

### 1.3.3. Linearidade do método

A linearidade é a capacidade de um método analítico em indicar se os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, dentro de um intervalo específico. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) igual ou superior a 0,99 (ANVISA, 2003).

De acordo com a figura 1.1, o método desenvolvido para doseamento do BNZ mostrou-se linear, dentro dos limites legais e avaliação estatística, no intervalo de 8 a 28  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 1. 1: Curva de calibração do BNZ em solução metanol:água (1:1) no comprimento de onda 324nm.**

A análise de regressão linear revelou um índice de correlação linear ( $R^2$ ) no valor de 0,998. A equação correspondente a curva média de calibração (Figura 1.1) é: Absorbância =  $0,0297 \cdot \text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) - 0,0133$ .

### 1.3.4. Exatidão do método

A exatidão expressa a proximidade entre o valor experimental encontrado pelo método e o valor de concentração real ou aceito como referência (FDA, 2001; ICH Q2B, 1996; ICH Q2(R1), 2005). As amostras testadas (15, 20, 25  $\mu\text{g/mL}$ ), expressas na tabela 1.3 como recuperação, apresentaram respostas próximas às esperadas. A análise estatística dos dados não mostrou diferença significativa, comprovando a exatidão do método.

**Tabela 1. 3: Dados de exatidão do método analítico.**

Amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)
15	101,2
20	100,5
25	99,86
<b>Exatidão média</b>	100,5
<b>CV<sup>a</sup> (%)</b>	0,67

<sup>a</sup>Dados representados como a média e coeficiente de variação [CV] dos resultados, n= 3.

### 1.3.5. Precisão do método

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, em condições experimentais definidas. Quanto mais próximos os valores experimentais obtidos estiverem entre si, maior será a precisão do método (THOMPSON et al., 2002).

Os resultados do ensaio de precisão encontram-se descritos na tabela 1.4.

**Tabela 1. 4: Dados de precisão do método analítico.**

PRECISÃO	Concentração média	CV <sub>D</sub> (%)	CV <sub>A</sub> (%)	
RI (n=10)	20,10	0,23	-	
RM (n=6)	20,01	0,67	-	
PI Analista 1 (n=3)	19,54	2,29	1,60	
	Dia 1			20,38
				20,99
				20,35
	Dia 2			20,18
				20,28
PI Analista 2 (n=3)	20,18	0,65		
	Dia 1			20,14
				20,01
				20,31
	Dia 2			20,08
				20,35

RI = repetibilidade instrumental, RM = repetibilidade do método, PI = precisão intermediária, CV<sub>D</sub> = coeficiente de variação de cada grupo e CV<sub>A</sub> = coeficiente de variação entre os analistas.

O método analítico mostrou-se bastante preciso quanto à variabilidade do instrumento de medição [RI], que apresentou um coeficiente de variação de 0,23%. Em relação à repetibilidade do método [RM] o valor encontrado para a média dos coeficientes de variação nos três níveis de concentração avaliados foi de 0,67% (Tabela 1.4). Quanto à precisão intermediária [PI] concluiu-se que não existem diferenças estatisticamente

*Flávia Pires Maximiano*

significativas entre as respostas, em dias diferentes e com analistas diferentes, para um intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de variação encontrado para esse parâmetro também se situou em torno a 1,6%, satisfazendo os limites estabelecidos pela ANVISA, que admitem um CV de até 5% (ANVISA, 2003).

### **1.3.6. Limite de detecção e Limite de quantificação do método**

O LD é a concentração mais baixa da substância em análise que pode ser detectada com alguma confiabilidade, enquanto que o LQ é a concentração mais baixa que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitável (ICH Q2B, 1996; ICH Q2(R1), 2005; IUPAC, 2002).

Os LD e LQ obtidos a partir das leituras dos brancos foram 0,05µg/mL e 0,17µg/mL, respectivamente. Os valores encontrados evidenciam a elevada sensibilidade do método para o BNZ e sua adequação a utilização prevista. Esse resultado habilita o doseamento do BNZ em situações em que a concentração de fármaco na amostra seja muito baixa, como no caso de ensaios de velocidade de dissolução ou de métodos empregados para validação de limpeza.

## **1.4. CONCLUSÃO**

O método espectrofotométrico validado provou ser robusto, preciso, exato, linear e seletivo frente a excipientes empregados nas formulações a base de BNZ, desenvolvidas neste trabalho. Esse procedimento analítico apresenta também limites de quantificação e detecção apropriados para doseamentos de rotina e quantificações analíticas do fármaco em ensaios de dissolução.

Além disso, a metodologia validada, amplamente empregada em métodos farmacopéicos, mostrou-se como uma alternativa equivalente aos métodos cromatográficos, devido à validação criteriosa de seus parâmetros analíticos, principalmente a especificidade, tendo ainda, como vantagens seu baixo custo, facilidade e rapidez de execução.

Com os resultados obtidos neste capítulo, pode-se concluir que o método é adequado para as análises futuras de controle de qualidade do BNZ, pois é um método rápido, de fácil execução e que cumpre com os requisitos de validação.

---

## Capítulo 2: Caracterização físico-química do fármaco benznidazol

### 2.1. INTRODUÇÃO

A pesquisa e desenvolvimento de medicamentos inovadores tem sido uma empreitada cada vez mais cara e complexa, o que torna mais escassa a introdução de novas moléculas no mercado (JOSHI et al., 2007). Estima-se que de cada 30.000 compostos sintetizados, apenas 0,003% chegam a se tornar fármacos disponíveis no comércio (FEDERSEL et al., 2003). Dentre as causas que explicam esses inúmeros fracassos estão problemas derivados de sua biodisponibilidade e toxicidade, que podem estar relacionados ao escasso conhecimento acerca da natureza da molécula em estudo (WANG et al., 2004).

Neste contexto, os estudos de pré-formulação, realizados nas etapas de pesquisa pré-clínica e clínica de fármacos inovadores, e que visam acumular o máximo de informação sobre o comportamento das novas entidades químicas, constituem um valioso instrumento para traçar estratégias de desenvolvimento racional de formulações mais eficazes e seguras e, portanto com maiores possibilidades de êxito (PEREIRA et al., 2005; SWAMIVELMANICKAM et al., 2009). Diversos aspectos concernentes a substância ativa, como a biodisponibilidade a partir da forma farmacêutica, ou ao medicamento, como seu prazo de validade, e até mesmo seu processamento industrial são afetados pelas propriedades físico-químicas dos fármacos.

O benznidazol apesar de ser um fármaco já consolidado no mercado e bastante estudado do ponto de vista farmacológico, tem suas propriedades físico-químicas praticamente desconhecidas e por isso, estudos de pré-formulação poderiam propiciar uma maior compreensão das suas características biofarmacêuticas e permitir o desenvolvimento de formas farmacêuticas alternativas para melhorar sua ação terapêutica.

O objetivo deste estudo foi traçar o perfil físico-químico do benznidazol através de diferentes ensaios de caracterização, como forma de estabelecer parâmetros de qualidade para esse composto e auxiliar no melhoramento tecnológico de medicamentos a base desse fármaco antichagásico.

Dentre os estudos de caracterização físico-química realizados com o benznidazol nesta dissertação destacam-se a solubilidade, a velocidade intrínseca de dissolução, o coeficiente de partição, o tamanho e área superficial específica da partícula, a densidade real e as propriedades reológicas. Outras características importantes como os perfis térmico e

difratométrico, e a higroscopicidade também foram determinadas, bem como a presença de formas polimórficas e compatibilidade do benznidazol com diferentes adjuvantes, que serão abordados no capítulo seguinte.

## **2.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.1. Materiais**

Benznidazol [BNZ] lote 13871 produzido pelos laboratórios Roche. Os solventes utilizados foram: dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metanol, acetona, acetonitrila, 1-octanol, etanol, isopropanol, diclorometano, hexano, clorofórmio, éter de petróleo, acetonitrila, e acetato de etila. Todos os solventes e reagentes utilizados nos ensaios foram de pureza analítica.

### **2.2.2. Ensaio de solubilidade**

Os estudos foram conduzidos utilizando excesso de fármaco pulverizado em 10mL de diferentes meios líquidos. As amostras foram submetidas à banho de ultrassom por 15 minutos, em seguida, foram colocadas sob agitação magnética vigorosa a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  até o estabelecimento do equilíbrio de saturação, ao final deste período, as amostras foram filtradas ( $0,45\mu\text{m}$ ) e doseadas por metodologia espectrofotométrica previamente validada a 324nm. Esse experimento foi realizado em triplicata e a saturação das amostras foi previamente determinada em 48 horas.

Os solventes de diferentes naturezas e polaridades foram utilizados como meios líquidos e encontram-se listados a seguir: água destilada, metanol, etanol, acetona, acetato de etila; isopropanol, diclorometano, hexano, clorofórmio, éter de petróleo, acetonitrila, 1-octanol, fluido gástrico simulado pH 1,2 (USP 30, 2008), fluido entérico simulado pH 6,8 (USP 30, 2008), solução aquosa de lauril sulfato de sódio [LSS] em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 %), óleo mineral e óleo de amêndoas.

### 2.2.3. Velocidade intrínseca de dissolução

Para determinar a velocidade intrínseca de dissolução do BNZ [VID], foram preparados discos compactos não desintegráveis deste fármaco empregando pressões elevadas em uma compressora excêntrica (FABBE<sup>®</sup>) utilizando punções circulares planos de 12mm. Os comprimidos de BNZ obtidos com elevada dureza e superfícies lisas foram recobertos por parafina, de forma que o topo e as laterais do comprimido ficassem revestidos e somente uma das faces de área calculada igual a 1,13cm<sup>2</sup> permanecesse exposta.

O ensaio de dissolução foi realizado em um dissolutor modelo 299 (Nova Ética<sup>®</sup>), utilizando 900mL de fluido gástrico simulado como meio de dissolução a 37°C e pás como aparato de agitação a uma velocidade de 75rpm (USP 30, 2008). Os comprimidos foram fixados ao fundo da cuba com auxílio de uma malha de aço inox e com a face sem parafina exposta ao meio de dissolução. Amostras do meio foram coletadas em tempos programados, filtradas e quantificadas quanto à concentração de BNZ utilizando metodologia espectrofotométrica previamente validada.

O ensaio foi realizado em quintuplicata e a VID foi obtida a partir do coeficiente angular da regressão linear calculado a partir da quantidade de fármaco dissolvido por unidade de superfície em função do tempo, conforme descreve a equação de Noyes-Nernst a seguir (ZAKERI-MILANI et al., 2009).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} (C_s - C) \quad \text{Equação (2.1)}$$

### 2.2.4. Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição do BNZ foi obtido conforme método de agitação moderada validado para fármacos de baixa solubilidade aquosa (OECD, 2003). Utilizou-se como fase orgânica, 1-octanol e como fase aquosa, água destilada, fluido gástrico simulado pH 1,2 e fluido entérico simulado pH 6,8 (USP 30, 2008). Os meios de partição foram submetidos à saturação mútua por dois dias, com temperatura controlada de 25°C antes do estudo.

O BNZ foi previamente solubilizado na fase orgânica e colocado junto à fase aquosa sob agitação magnética durante cinco dias a 25°C. A turbulência na interface de separação dos meios foi controlada, de forma a evitar a emulsificação do 1-octanol na fase aquosa. Ao final, a concentração de fármaco nas fases aquosa e octanólica foi quantificada por



espectrofotometria na região do ultravioleta a 324nm, utilizando metodologia validada. O experimento foi realizado em triplicata. O coeficiente de partição foi representado pelo logaritmo de base 10 da relação entre a concentração de fármaco nas fases octanólica e aquosa [LogP<sub>ow</sub>].

### 2.2.5. Determinação do perfil térmico

De forma a determinar o comportamento térmico do BNZ, medidas de calorimetria exploratória diferencial [DSC] foram conseguidas utilizando os calorímetros MDSC Q100 (TA Instruments<sup>®</sup>) e DSC 2010 (TA Instruments<sup>®</sup>). Nitrogênio foi utilizado como gás de purga com fluxo de 50mL/min. A calibração do equipamento foi realizada com padrões de índio (ponto de fusão de 156,63°C e energia de transição de 28,45J/g) e zinco (ponto de fusão de 419,58°C e energia de transição de 100,50J/g).

Amostras de BNZ, de aproximadamente 3mg, foram colocadas em porta-amostras de alumínio planos tampados e foram submetidas à velocidade de aquecimento de 10°C/min no intervalo de temperaturas de 30 a 300°C. Ciclos de aquecimento-resfriamento-aquecimento também foram realizados de forma a confirmar os fenômenos térmicos empregando velocidade de 10°C/min.

A pureza do princípio ativo foi conseguida a partir de análises segundo a equação de Van't Hoff, empregando o *software* TA Universal Analysis 2000 V4. Para tanto, amostras de 2mg foram submetidas a aquecimento de 2°C/min partindo da temperatura de 30 até 200°C (USP 30, 2008).

A umidade residual do fármaco foi determinada utilizando termobalança de infravermelho Eurotherm (Gibertini<sup>®</sup>). Foram pesadas amostras contendo 1,0g de fármaco e submetidas a aquecimento através do infravermelho, até que a variação de peso fosse inferior a 0,25%. Os valores representam a média de cinco determinações e são expressos em porcentagem (%p/p).

### 2.2.6. Determinação do perfil difratométrico

Ensaio de difração de raios-X do pó foram realizados em amostras de BNZ empregando um equipamento XRD-6000 (Shimadzu<sup>®</sup>), utilizando ânodo de Fe e monocromador de grafite e no intervalo de 2 a 60° 2θ.

### 2.2.7. Determinação da superfície específica

A área superficial específica do BNZ foi determinada por meio da técnica de adsorção de nitrogênio aplicando o modelo proposto por Brunauer, Emmett e Teller [BET] (STANLEY-WOOD, 1983; FUNGARO; BRUNO, 2009). Amostras de fármaco previamente degaseificadas por 24h a 40°C foram analisadas no equipamento BET Surface Area Analyser (Nova<sup>®</sup> 1000).

### 2.2.8. Determinação da densidade real

A densidade real do fármaco foi determinada por picnometria de gás hélio, conforme descrito na Farmacopéia Americana, em duplicata utilizando um picnômetro Quantachrome MPY (USP 30, 2008).

### 2.2.9. Análise morfológica e granulométrica

A avaliação da morfologia dos cristais de BNZ foi realizada por microscopia eletrônica de varredura [MEV] utilizando um microscópio de marca JEOL JSM-5510. As amostras foram previamente recobertas com grafita.

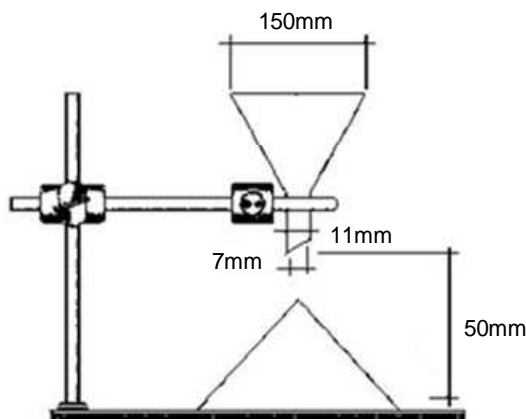
A distribuição dos tamanhos de partícula do lote de BNZ foi determinada por tamisação a partir de 50g de material utilizando um tamisador Bertel<sup>®</sup>. O tamanho médio de partícula do fármaco foi calculado a partir de análise estatística utilizando o método de probabilidades (VILA JATO, 1997).

### 2.2.10. Medidas reológicas

As propriedades de fluxo dos cristais de BNZ foram avaliadas baseando-se nas técnicas propostas por Carr (1965) e em parâmetros farmacopéicos (CARR, 1965; USP 30, 2008).

O ângulo de repouso foi medido pelo cone de pó formado pelo escoamento de 50g do fármaco através de um funil de dimensões padronizadas (STANIFORTH, 2005) sobre uma superfície plana (Figura 2.1). O ângulo formado entre o cone e a superfície foi medido com auxílio de um transferidor. O tempo de escoamento foi determinado pela medida do tempo

necessário para o escoamento de uma quantidade predefinida de fármaco através de um funil padronizado utilizando um cronômetro digital.



**Figura 2. 1: Aparato para determinação do ângulo de repouso e tempo de escoamento.**

A compressibilidade ( $C_P$ ) e o índice de Hausner (IH) foram calculados a partir de medidas de volume aparente do sólido antes ( $V_o$ ) e após ( $V_f$ ) serem submetidos a compactações com auxílio de uma proveta empregando as seguintes equações:

$$C_P (\%) = \frac{V_o - V_f}{V_o} \times 100 \quad \text{Equação (2.2)} \quad \text{IH} (\%) = \frac{V_o}{V_f} \times 100 \quad \text{Equação (2.3)}$$

Onde,  $C_P$  representa o índice de compressibilidade e IH, índice de Hausner.

A densidade de enchimento foi calculada a partir da relação entre massa de BNZ e volume ocupado pelo sólido após escoamento espontâneo em uma proveta. Todas as medidas de fluxo do pó foram realizadas em triplicata.

### 2.2.11. Estudos de higroscopicidade

A habilidade do BNZ de interagir com a umidade ambiental atmosférica foi estudada empregando-se o modelo experimental estabelecido por Callahan e colaboradores (1982) (CALLAHAN, 1982). Amostras de BNZ foram expostas a 10 condições de umidades relativa diferentes (0-100%), durante 7 dias. Estas condições foram obtidas utilizando soluções salinas saturadas (Tabela 2.1) em sistemas fechados (potes plásticos tampados) a 25°C (GREENSPAN, 1977). A quantidade de água absorvida pelas amostras foi medida por gravimetria através do monitoramento do incremento de peso percentual das amostras de

BNZ em pó, previamente dessecadas, e após o tempo de exposição nas diferentes condições de umidade atmosférica relativa. O experimento foi executado em triplicata.

**Tabela 2. 1: Condições de umidade relativa obtidas a partir de soluções saturadas de diferentes sais, a 25°C.**

Umidade Relativa [UR%] <sup>*</sup>	Solução saturada a 25°C
0	Sílica-gel
8,23±0,72	Hidróxido de potássio
22,51±0,32	Acetato de potássio
32,78±0,16	Cloreto de magnésio
43,16±0,39	Carbonato de potássio
68,89±0,24	Iodeto de potássio
75,29±0,12	Cloreto de sódio
80,99±0,28	Sulfato de amônio
93,58±0,55	Nitrato de potássio
97,30±0,45	Sulfato de potássio

<sup>\*</sup>Adaptado de Grenspan, 1977.

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades físico-químicas do BNZ foram estudadas na tentativa de propiciar uma maior compreensão de suas características biofarmacêuticas permitindo vislumbrar alternativas para melhorar sua ação terapêutica. A seguir, descrevem-se os resultados obtidos nos diferentes ensaios.

### 2.3.1. Ensaio de Solubilidade

A solubilidade dos fármacos é uma propriedade que influencia diferentes aspectos relativos à farmacocinética e estabilidade química da molécula. Auxilia também na escolha do solvente mais adequado para utilizações analíticas, assim como na eleição do veículo mais idôneo para uso em ensaios *in vivo* ou para uma possível formulação líquida do fármaco.

Os dados experimentais obtidos revelaram que os solventes com maior capacidade para dissolver o BNZ e que, portanto são os mais recomendáveis para utilização em métodos analíticos e extrações desse composto foram o metanol, a acetonitrila e a acetona (Tabela 2.2).

**Tabela 2. 2: Solubilidade do BNZ em diferentes solventes a 25°C.**

Solvente	Solubilidade (mg/mL) <sup>a</sup>	Classificação experimental <sup>b</sup>	Monografia Farm. Bras. IV <sup>c</sup>
Água Destilada	0,237 (0,012)	Muito pouco solúvel	Muito pouco solúvel
Metanol	13,078 (2,240)	Ligeiramente solúvel	Ligeiramente solúvel
Etanol	4,989 (0,359)	Pouco solúvel	Ligeiramente solúvel
Acetona	30,546 (0,249)	Ligeiramente solúvel	Pouco solúvel
Acetado de etila	3,550 (0,092)	Pouco solúvel	Ligeiramente solúvel
Isopropanol	1,940 (0,130)	Pouco solúvel	Muito pouco solúvel
Diclorometano	3,138 (0,192)	Pouco solúvel	Ligeiramente solúvel
Hexano	0,141 (0,048)	Muito pouco solúvel	Solúvel
Clorofórmio	1,499 (0,267)	Pouco solúvel	Muito pouco solúvel
Éter de petróleo	0,067 (0,007)	Praticamente insolúvel	Praticamente insolúvel
Acetonitrila	24,741 (2,866)	Ligeiramente solúvel	-
1-octanol	0,530 (0,024)	Muito pouco solúvel	-
Fluido gástrico	0,236 (0,004)	Muito pouco solúvel	-
Fluido entérico	0,244 (0,012)	Muito pouco solúvel	-
0,1 %	0,219 (0,002)	Muito pouco solúvel	-
LSS 0,2 %	0,229 (0,014)	Muito pouco solúvel	-
0,5 %	0,299 (0,008)	Muito pouco solúvel	-
1,0 %	0,406 (0,013)	Muito pouco solúvel	-
Óleo mineral	0,003 (0,001)	Praticamente insolúvel	-
Óleo de amêndoas	0,029 (0,001)	Praticamente insolúvel	-

<sup>a</sup>Dados representados com a média e desvio padrão (entre parênteses) dos resultados, n=3.

<sup>b</sup>De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV edição.

<sup>c</sup>Classificação estabelecida pela monografia do BNZ na Farmacopéia Brasileira IV edição.

Notam-se algumas diferenças dos resultados desse ensaio com respeito aos valores de solubilidade descritos na literatura. A solubilidade aquosa do BNZ, é citada em algumas publicações como 0,4mg/mL (LAMAS et al., 2006; LEONARDI et al., 2009), afastando-se do valor experimental encontrado de 0,2mg/mL em água destilada ou nos fluidos gástrico e entérico simulados. Esse dado demonstra que o fármaco não se ioniza nas condições avaliadas, o que já era esperado, uma vez que a molécula de BNZ não apresenta grupos facilmente ionizáveis (Figura 2).

Observa-se também que mesmo apresentando uma solubilidade limitada em água, os valores encontrados para alguns veículos oleosos (óleo de amêndoas e óleo mineral) são ainda mais reduzidos. A presença de um tensoativo, como o LSS, possibilita incrementar a solubilidade aquosa do BNZ somente em concentrações elevadas.

Destacam-se ainda as divergências existentes em relação à classificação da solubilidade farmacopeica encontrada na monografia do BNZ na Farmacopéia Brasileira IV edição. Para alguns solventes, acetona e isopropanol, a solubilidade experimental é superior à descrita na monografia, o que pode ser explicado pela diferença de metodologia empregada,

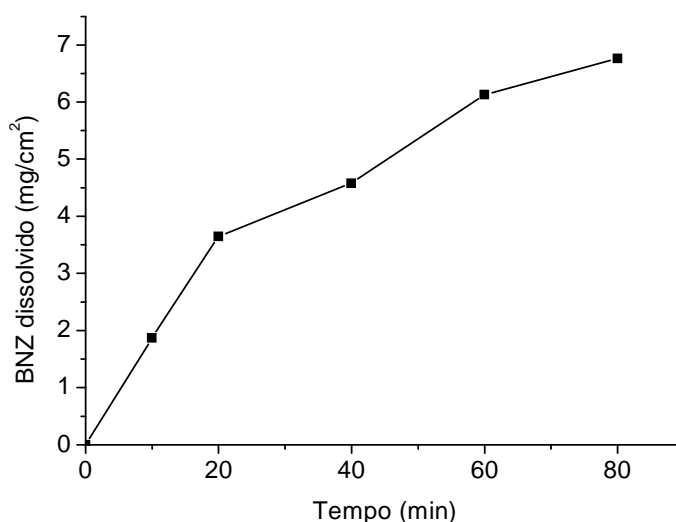
*Flávia Pires Maximiano*

uma vez que o ensaio farmacopéico não garante condições de saturação das amostras. No entanto, para os solventes, etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, as solubilidades farmacopeicas declaradas são superiores aos dados de solubilidade determinados neste estudo. Os resultados aportados poderão servir de base para uma futura revisão e complementação da monografia oficial do BNZ na farmacopéia brasileira.

### 2.3.2. Velocidade intrínseca de dissolução

A velocidade intrínseca de dissolução [VID] é uma característica inerente a cada substância sólida, e diferentemente das medidas de solubilidade, que se baseiam no equilíbrio, essa constitui um parâmetro cinético dependente da molhabilidade e da difusibilidade do composto. A determinação da VID fornece indícios se determinado fármaco apresentará problemas de biodisponibilidade em função de suas características de dissolução.

Durante o ensaio, a quantidade de BNZ dissolvido no meio aumentou com o tempo de forma linear até os primeiros 20 minutos, quando a velocidade de dissolução parcial do fármaco começou a declinar, em função da variabilidade das condições hidrodinâmicas do ensaio (Figura 2.2).



**Figura 2. 2: Perfil de dissolução intrínseca do BNZ.** Dados obtidos a partir de comprimidos de área superficial  $1,13\text{cm}^2$ , em condições *sink* a  $37^\circ\text{C}$ .

A VID obtida para o BNZ, calculada a partir da porção linear inicial da curva foi de  $0,182\text{mg/cm}^2/\text{min}$ , valor inferior ao mínimo recomendável de  $1\text{mg/cm}^2/\text{min}$ , o que indica que

a dissolução desse fármaco poderá ser um fator limitante de sua absorção (ZAKERI-MILANI et al., 2009).

### 2.3.3. Coeficiente de partição do benznidazol

O coeficiente de partição [ $\text{LogP}_{ow}$ ] fornece informações sobre a facilidade dos fármacos em atravessar as membranas biológicas. Essa medida da permeabilidade *in vitro* foi determinada para o BNZ utilizando o método de agitação moderada, que emprega uma agitação controlada na interface das fases orgânica e aquosa, de maneira a evitar a formação de micro-gotas de octanol na fase aquosa (OECD, 2003). Esse método apresenta-se mais confiável que o método tradicional de agitação em funil de separação que por sua vez, promove a emulsificação da fase orgânica na fase aquosa propiciando uma sobreestimação da concentração do fármaco nesta fase, que no caso de fármacos pouco solúveis em água, como o BNZ, acarreta um erro significativo para o cálculo de  $\text{LogP}_{ow}$ .

Os valores de  $\text{LogP}_{ow}$  para o BNZ encontram-se descritos na tabela 2.3. Valores similares de  $\text{LogP}_{ow}$ , em torno de 0,7, foram encontrados na literatura para os diferentes meios aquosos. Estimativas teóricas relativas ao  $\text{LogP}_{ow}$  do BNZ utilizando modelagem molecular por diferentes *softwares* disponíveis (ClogP<sup>®</sup>, KowWIN<sup>®</sup>, miLogP2.2<sup>®</sup>, ACDLogP<sup>®</sup>) apresentaram valores entre 0,7 a 1,2 (MACHATHA; YALKOWSKY, 2005).

**Tabela 2. 3: Coeficiente de partição de BNZ. Dados baseados em valores experimentais e em estimativas *in silico*.**

Meio aquoso	Concentração média Fase Orgânica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração média Fase Aquosa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log P <sub>ow</sub>	Estimativas Matemáticas de Log P	
				ClogP	
Água destilada	373,707 (14,505)	63,186 (3,962)	0,772 (0,019)	KowWin	0,9
Fluido Gástrico	359,914 (6,465)	59,207 (0,431)	0,784 (0,011)	miLogP2 .2	1,22
Fluido Entérico	380,029 (3,292)	65,689 (4,508)	0,763 (0,027)	ACDlogP	0,778
					0,91

Dados representados como média e desvio padrão (entre parênteses) dos resultados, n=3.

Os dados experimentais situam-se dentro a faixa prevista *in silico*, no entanto, estes apresentam um amplo intervalo de valores dependendo do modelo matemático empregado por

cada *software*, o que evidencia a necessidade de sua determinação experimental como forma de elevar o nível de precisão deste ensaio.

O tradicional sistema de classificação biofarmacêutica divide os fármacos em 4 categorias, segundo suas características de solubilidade e de permeabilidade (AMIDON et al., 1995). A falta de informações experimentais sobre essas medidas para o BNZ tem causado interpretações dúbias sobre a classificação biofarmacêutica deste fármaco, que segundo publicações recentes, chegou a ser inserido na categoria II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) (LIMA et al., 2009; KASIM et al., 2004).

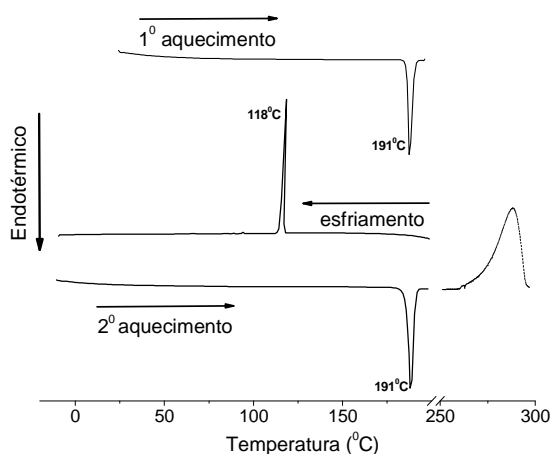
O valor de  $\text{LogP}_{\text{ow}}$  do BNZ, encontrado neste trabalho é baixo, e por isso, não garante uma imediata permeação da molécula, que só ocorreria com substâncias com  $\text{LogP}_{\text{ow}}$  superiores a 1,7 (KASIM et al., 2004). Considerando essa medida de permeabilidade e a reduzida solubilidade aquosa do BNZ (Tabela 2.2), sugere-se incluir esse antichagásico no grupo IV da classificação biofarmacêutica, ou seja, um fármaco de baixa permeabilidade e de baixa solubilidade.

#### 2.3.4. Perfil térmico do benznidazol

Um número elevado de eventos químicos e físicos pode ser detectado utilizando-se técnicas térmicas como o DSC (BERNAL et al., 2002). Conforme se observa na figura 2.3, o BNZ apresentou um pico endotérmico de fusão a 191,3°C com entalpia associada de aproximadamente 140J/g e degradação iniciando-se a partir de 240°C.

A figura 2.3 mostra também que o resfriamento do BNZ, logo após a fusão, promoveu a recristalização do fármaco, evidenciada por um pico exotérmico bem definido a 118°C envolvendo uma entalpia de 95J/g. Durante o segundo aquecimento dessa amostra, a fusão do fármaco ocorreu novamente na mesma temperatura e com valor similar de energia, o que confirma a natureza desses fenômenos e comprova que a segunda cristalização origina a mesma fase cristalina inicial.



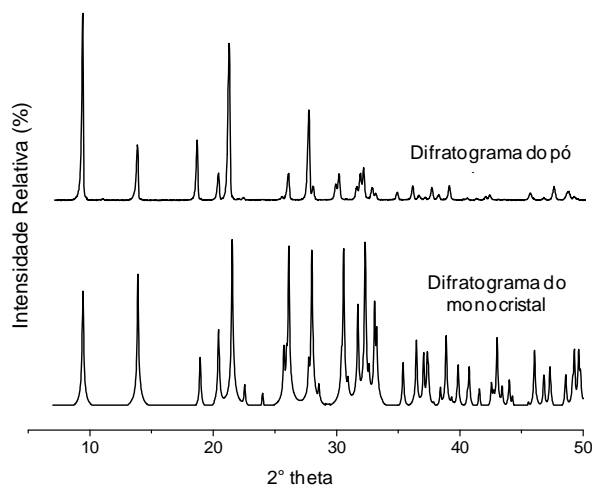


**Figura 2. 3: Curvas de DSC do BNZ obtido em um ciclo de aquecimento-resfriamento-aquecimento (+200°C; -20°C; +300°C).**

A determinação da pureza do BNZ possui especial relevância, uma vez que suas impurezas de síntese não estão estudadas a nível toxicológico. O método térmico baseado na equação de Van't Hoff é recomendado pela farmacopéia para análise de fármacos e representa um método rápido e preciso para esse tipo de determinação (USP 30, 2008). O lote de BNZ analisado apresentou elevada pureza estimada em 99,43%. A umidade residual encontrada para o lote testado foi de 0,93% ( $\pm 0,38$ ).

### 2.3.5. Perfil difratométrico do benznidazol

Neste ensaio foi estabelecido o padrão de difração de raios-X do pó para o BNZ. O resultado está mostrado na figura 2.4.



**Figura 2. 3: Difratograma de raios-X do pó e do monocristal do BNZ.**

De acordo com o difratograma, que é capaz de determinar a pureza física de um composto, observou-se um perfil tipicamente policristalino, com picos principais bem definidos posicionados a 9,4; 13,9; 18,9; 20,4; 21,5 e 26,1° 2 $\theta$ .

Foram percebidas algumas flutuações nas intensidades relativas dos picos do BNZ quando comparado com seu difratograma padrão simulado a partir dos dados de raios-X do monocristal (SOARES-SOBRINHO et al., 2008). Essas variações podem ser justificadas pela orientação preferencial dos cristais e indicam tratar-se da mesma forma cristalina estabelecida na literatura. Alterações na fase cristalina do fármaco, como o aparecimento de formas polimórficas, seriam facilmente identificadas por esse teste, com um elevado grau de segurança. Devido à relevância do controle cristalino atualmente recomendado para fármacos, o perfil difratométrico constitui, portanto uma ferramenta importante, juntamente com os métodos térmicos, para ser aplicada a rotina do controle de qualidade de matérias-primas de uso farmacêutico.

### 2.3.6. Superfície específica do benznidazol

A área superficial específica do BNZ, determinada pelas isotermas de adsorção do nitrogênio, revelou um valor de superfície de 0,5m<sup>2</sup>/g e reduzida porosidade das partículas, estimada em 1,4·10<sup>-3</sup>cm<sup>3</sup>/Kg (Tabela 2.4). Esses dados explicam sua lenta velocidade intrínseca de dissolução e justificam as deficientes propriedades de fluxo desse produto.

**Tabela 2. 4: Valores de superfície específica e porosidade das partículas de BNZ obtidos através da análise de BET.**

Propriedade	BNZ
Superfície Específica BET (m <sup>2</sup> /g)	0,50
Volume de Microporos (cm <sup>3</sup> /kg)	0,0003
Área de Microporos (m <sup>2</sup> /g)	0,82
Tamanho médio dos Microporos (nm)	8,23
Volume Total de Poros (cm <sup>3</sup> /kg)	0,00141
Diâmetro Máximo dos Poros (Å)	1376,1
Diâmetro Médio dos Poros (Å)	112,8

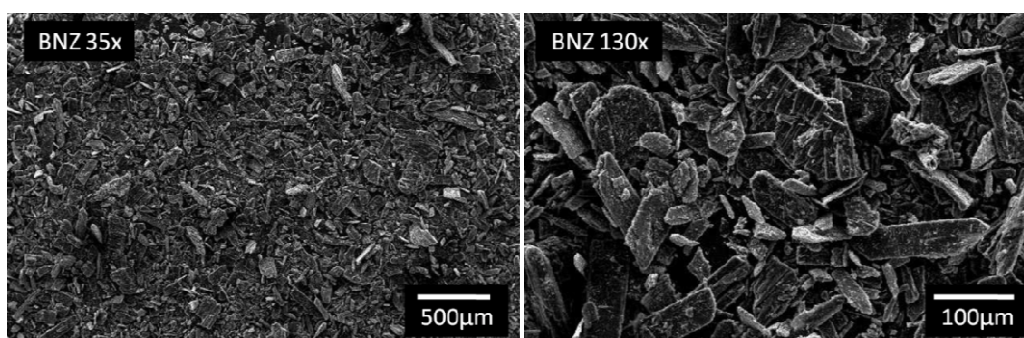
### 2.3.7. Densidade real do benznidazol

A densidade de um sólido pode adotar diferentes valores em função da técnica empregada em sua determinação. A densidade picnométria ou real, encontrada para o BNZ foi

de  $1,35\text{g/cm}^3$ . Este valor se aproxima ao valor referenciado no ensaio do monocrystal ( $1,44\text{g/cm}^3$ ), o que sugere a inexistência de microporos ou de espaços vazios penetráveis pelo gás nos cristais de BNZ (SOARES-SOBRINHO et al., 2008). Essa medida de densidade real poderá servir como referência para o controle do polimorfismo ou do grau de cristalinidade do BNZ, uma vez que alterações nessas propriedades influenciam consideravelmente a densidade de um sólido.

### 2.3.8. Morfologia e granulometria das partículas de benznidazol

Os cristais de BNZ apresentam hábito cristalino monoclinico acicular, conforme as fotomicrografias da figura 2.5.



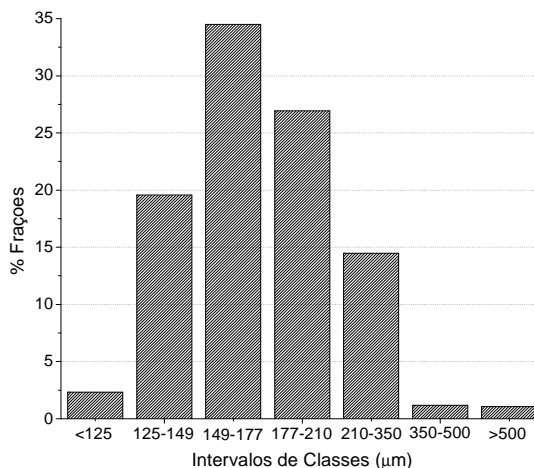
**Figura 2. 4: Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos cristais típicos de BNZ. Nos aumentos de 35x (esquerda) e 130x (direita).**

A análise morfológica de fármacos constitui um parâmetro de fácil monitoramento e capaz de detectar mudanças cristalinas em decorrência de variações no processo de síntese ou mesmo no processamento farmacêutico.

A distribuição granulométrica dos insumos farmacêuticos exerce importante influência em aspectos relacionados às etapas da produção de um medicamento, como em processos de mistura e de enchimento de máquinas, assim como em sua estabilidade e eficácia biológica. No caso do BNZ, deve haver um controle rigoroso do tamanho de partícula, uma vez que esse parâmetro físico possui influência direta em sua velocidade de dissolução, um fator crítico para sua biodisponibilidade (BRANDÃO et al., 2008).

Os dados de tamisação do BNZ se ajustaram a uma distribuição logarítimo normal, o que permitiu determinar os valores de diâmetro médio de partícula e desvio padrão geométrico em  $192,2\mu\text{m}$  e  $0,12$ , respectivamente. Conforme se observa no histograma da

figura 2.6, a distribuição do tamanho de partícula do BNZ é relativamente fechada e com tamanhos de partícula consideráveis.



**Figura 2. 5: Distribuição de frequência do tamanho de partículas de BNZ.**

### 2.3.9. Medidas reológicas

O estudo das propriedades de fluxo dos materiais é crucial no processo de fabricação de qualquer forma farmacêutica unidose, uma vez que exerce influência na alimentação uniforme das máquinas de compressão e também nas propriedades físicas e mecânicas dos comprimidos (SCHÜSSELE; BAUER-BRANDL, 2003).

Diferentemente de outros tipos de mensurações, a reologia dos sólidos não é uma propriedade inerente ao material e sim, o resultado da combinação das propriedades físicas que afetam seu fluxo e do equipamento empregado no seu processamento, de maneira que é recomendável utilizar diferentes metodologias para avaliar esse parâmetro, várias delas encontram-se descritas nas farmacopéias (PRESCOTT; BARNUM, 2000).

As medidas reológicas realizadas para o BNZ encontram-se resumidas na tabela 2.5 e classificadas segundo Carr (1965) (CARR, 1965).

**Tabela 2. 5: Medidas de fluxo do BNZ.**

Parâmetro	Resultados <sup>a</sup>	Classificação
Ângulo de repouso [°]	60 (3,5)	Muito deficiente
Índice de Compressibilidade [%]	40,7 (1,2)	Extremamente deficiente
Índice de Hausner	1,68 (0,03)	Extremamente deficiente
Tempo de escoamento [s]	∞	-
Densidade de enchimento [g/mL]	0,39 (0,01)	-

<sup>a</sup>Dados representados como a média e o desvio padrão (em parênteses) dos resultados, n=3.

Apesar de possuir um tamanho de partícula grande e de distribuição uniforme, o resultado dos diferentes ensaios realizados permite situar esse fármaco como um material bastante coesivo e de mobilidade extremamente comprometida.

A medida do ângulo de repouso só foi possível após escoamento forçado do pó com um bastão de vidro, conforme mostrado na figura 2.7. As medidas de Compressibilidade e de Índice de Hausner confirmam o fluxo deficiente do material apresentando valores muito superiores aos recomendados para insumos farmacêuticos.



**Figura 2. 6: Ângulo de repouso formado pelo escoamento forçado do BNZ.**

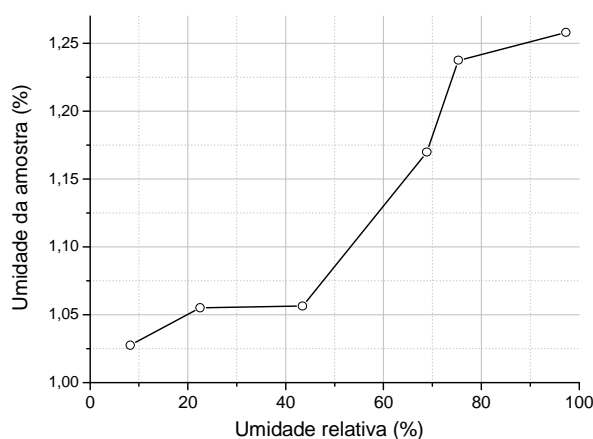
O BNZ não flui livremente possuindo tempo de escoamento infinito (Tabela 2.5). Esse comportamento pode ser explicado pela morfologia das partículas (Figura 2.5) que favorece interações interparticulares. A manipulação farmacêutica desse fármaco deve, portanto, requerer substâncias adjuvantes ou mesmo etapas adicionais de processamento industrial que promovam a mobilidade de suas partículas.

O BNZ apresentou ainda um baixo valor de densidade de enchimento o que praticamente o inviabiliza como candidato a compressão direta, método de produção de comprimidos mais vantajoso para a indústria farmacêutica (SÁ-BARRETO; CUNHA-FILHO, 2009).

### **2.3.10. Estudos de higroscopicidade**

A higroscopicidade de um fármaco refere-se a sua capacidade de captar água em função da umidade relativa ambiental. Considerando que a água é o veículo para as reações de decomposição dos princípios ativos, a estabilidade dos fármacos é afetada pelo seu percentual de umidade livre. As propriedades mecânicas dos materiais farmacêuticos também são criticamente influenciadas pelo teor de umidade dos sólidos (AULTON, 2007).

Os resultados desse ensaio (Figura 2.8) mostraram que mesmo quando o BNZ é conservado em umidades relativas elevadas não há captação de água apreciável, o que permite classificar esse composto como um material não higroscópico (CALLAHAN, 1982) A umidade relativa atmosférica não representa, portanto um parâmetro de risco para a manipulação e o armazenamento desse fármaco em estado sólido, de maneira que se poderão escolher materiais de envase mais flexíveis e baratos para esse princípio ativo e suas formas farmacêuticas.



**Figura 2. 7: Isoterma de sorção de umidade de BNZ a 25°C.**

## 2.4. CONCLUSÃO

O estudo apresentado aporta importantes informações sobre a natureza físico-química do fármaco BNZ, em sua maioria inéditas, que ajudarão a nortear o melhoramento farmacotécnico desse fármaco, assim como fornecem subsídios para o estabelecimento de um perfil de qualidade detalhado a ser adotado no controle de qualidade de rotina para esse fármaco e para as formulações que serão delineadas em etapas futuras deste trabalho.

Ao apresentar pela primeira vez sua classificação biofarmacêutica baseada em dados experimentais, será possível propor estratégias para atenuar os problemas de biodisponibilidade desse fármaco, tentando superar não apenas sua limitada solubilidade aquosa, mas também utilizando ferramentas que possam melhorar a sua lipossolubilidade, através de adjuvantes farmacêuticos apropriados.

Finalizada a etapa de caracterização físico-química, iniciou-se o estudo de polimorfismo cristalino e de compatibilidade fármaco-excipientes com o intuito de agregar mais conhecimento ao perfil físico-químico traçado do BNZ como será descrito no próximo capítulo.

---

## Capítulo 3: Estudo de polimorfismo cristalino e de compatibilidade térmica fármaco-excipiente

### 3.1. INTRODUÇÃO

O polimorfismo é a habilidade que um composto possui de originar espécies cristalinas distintas. Na prática farmacêutica, define-se este fenômeno como sendo a ocorrência de diferentes fases cristalinas de um mesmo fármaco (ALTONEN et al., 2009). A esta definição somam-se os termos solvatos e hidratos, distinções incluídas no termo pseudopolimorfismo (ICH, 2000).

Essa propriedade física inerente aos materiais cristalinos constitui uma das maiores preocupações da indústria farmacêutica na atualidade, uma vez que os polimorfos de um mesmo fármaco podem apresentar diferenças em suas propriedades físico-químicas, como em sua solubilidade e estabilidade, com repercussões importantes na biodisponibilidade do medicamento, prejudicando assim sua eficácia e segurança (SINGHAL et al., 2004).

O FDA recomenda que, durante o desenvolvimento de novos produtos, sejam realizadas buscas de possíveis formas polimórficas e solvatos empregando processos de recristalização. Aconselha-se ainda um rigoroso acompanhamento da pureza física do fármaco durante o seu processamento industrial e período de armazenamento (FDA, 2004).

Um trabalho publicado recentemente identificou pela primeira vez a forma cristalina do benznidazol (SOARES-SOBRINHO et al., 2008) contudo, nenhum estudo de polimorfos de benznidazol foi conduzido até a presente data.

Os estudos de compatibilidade são realizados para acelerar o desenvolvimento de formulações, permitindo a eliminação de excipientes que causam a degradação do fármaco. Alguns fatores podem afetar a compatibilidade entre o fármaco e os excipientes de uma formulação, como o pH e o teor de água, mas normalmente, as incompatibilidades podem surgir devido a uma degradação intrínseca do princípio ativo, facilitada pelos excipientes ou por reação química entre o fármaco e estes adjuvantes (DAMIEN, 2004). As interações no estado sólido entre fármacos e excipientes em formas farmacêuticas sólidas podem provocar mudanças na estabilidade, solubilidade, dissolução e biodisponibilidade dos fármacos.

A calorimetria exploratória diferencial associada a outras técnicas térmicas tem-se mostrado bastante vantajosa nos estudos de pré-formulação durante a investigação e predição de incompatibilidades físico-químicas entre fármacos e excipientes (ARAÚJO et al., 2005;

CIDES et al., 2006). Os estudos de compatibilidade fármaco-excipiente conduzidos por técnicas térmicas são capazes de conseguir a rápida avaliação de possíveis interações entre o fármaco e os excipientes através do aparecimento, deslocamento ou desaparecimento de eventos endotérmicos ou exotérmicos e/ou variações de valores de entalpia nas curvas DSC de misturas de fármaco-excipiente (STULZER et al., 2008). Durante os estudos de pré-formulação, na triagem inicial de excipientes assume-se que as propriedades térmicas de misturas ou de formulações testadas são iguais a soma das contribuições de cada componente individual (CLAS et al., 1999).

A primeira etapa deste capítulo foi dedicada a avaliar a presença de polimorfismo no benznidazol através de recristalizações em variadas condições, a fim de permitir o aparecimento de fases cristalinas diferentes desse produto. Em uma segunda etapa, estudou-se a compatibilidade térmica do benznidazol frente a alguns excipientes farmacêuticos selecionados.

## 3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1. Materiais

Benznidazol [BNZ] lote 13871 produzido pelos laboratórios Roche, com pureza de 99,43% obtida por DSC. Os solventes utilizados neste estudo, todos de grau analítico, foram: dimetilsulfóxido [DMSO] (Isofar<sup>®</sup>), dimetilformamida [DMF] (Synth<sup>®</sup>), metanol [MET] (Synth<sup>®</sup>), acetona [ACT] (Synth<sup>®</sup>), acetonitrila [ACN] (Vetec<sup>®</sup>), 1-octanol [OCT] (Tedia<sup>®</sup>), isopropanol [ISO] (Reagen<sup>®</sup>) e acetato de etila [ACE] (Impex<sup>®</sup>). Para os ensaios de compatibilidade os seguintes excipientes foram utilizados: Hidroxiethylcelulose Cellosize QP 300 [HEC], Polietilenoglicol 4000 [PEG], Amido parcialmente pré-gelatinizado Starch 1500 [STCH], Amido pré-gelatinizado StarCap 1500 [SCAP], Estearato de magnésio [MGST],  $\alpha$ -ciclodextrina [ $\alpha$ CD],  $\beta$ -ciclodextrina [ $\beta$ CD],  $\gamma$ -ciclodextrina [ $\gamma$ CD] e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina [HP $\beta$ CD].



### 3.2.2. Estudo de polimorfismo cristalino

#### 3.2.2.1. Seleção dos solventes para cristalização

O solvente utilizado na solubilização de uma substância determina a forma como as suas moléculas estarão solvatadas no meio, sendo a sua solubilidade condicionada pelas interações intermoleculares soluto-solvente. Essa conformação, em solução, exerce influência no arranjo molecular de produtos cristalizados a partir de soluções. Sendo assim, um dos parâmetros mais relevantes em um estudo de polimorfismo de fármacos é a seleção do solvente utilizado (GU et al., 2001).

Para este estudo, procurou-se utilizar solventes de diferentes naturezas químicas, polaridades variadas e que fossem capazes de solubilizar o BNZ em quantidades apreciáveis. De forma a aumentar as possibilidades de crescimento cristalino, definiu-se como concentração ideal de fármaco para o ensaio, concentrações próximas a saturação do solvente a temperatura ambiente. Foram preparadas soluções estoques de BNZ com cada solvente, que posteriormente foram fracionadas para as condições de cristalização estudadas.

#### 3.2.2.2. Condições de cristalização empregadas

Três condições distintas de cristalização, habitualmente utilizadas para esse tipo de ensaio (SHEKUNOV; YORK, 2000), foram empregadas, conforme descrito a seguir:

##### *Cristalização por adição de anti-solvente [CAA]*

Este método baseia-se na desestabilização da solução do fármaco através da adição de um solvente de baixa afinidade pelo mesmo (anti-solvente). Neste caso, a água foi escolhida como anti-solvente, devido a sua miscibilidade com a maioria dos solventes selecionados e pela reduzida solubilidade do BNZ nesse meio. A cristalização foi provocada após adição de água sob agitação magnética, sendo o precipitado formado, separado por centrifugação e seco a temperatura ambiente em dessecador a vácuo até a remoção completa do solvente (WANG et al., 2005).

#### *Cristalização por evaporação do solvente [CEV]*

Esta condição consiste em manter a solução de fármaco em repouso a temperatura ambiente e esperar que a evaporação lenta do solvente provoque a cristalização do fármaco (CAPES; CAMERON, 2007). As soluções de BNZ foram colocadas em microtubos de 1,5mL (Eppendorf®) e mantidas em repouso à temperatura ambiente por até 4 dias. O sólido foi separado por centrifugação e seco a temperatura ambiente em dessecador a vácuo até a remoção completa do solvente.

#### *Cristalização por resfriamento [CRE]*

Essa condição de cristalização fundamenta-se na redução de solubilidade do sistema em função da diminuição da temperatura do mesmo (THRELFALL, 2000). Para tanto, alíquotas de solução de BNZ foram colocadas em microtubos de 1,5mL (Eppendorf®) e mantidas a 5°C por 24 horas. Os cristais obtidos foram separados por centrifugação e secos a vácuo até a remoção completa do solvente.

#### *3.2.2.3. Caracterização dos cristais obtidos*

#### *Calorimetria exploratória diferencial [DSC]*

O perfil térmico das amostras de BNZ recristalizado foi obtido mediante calorimetria exploratória diferencial utilizando o calorímetro modelo DSC 2010 (TA Instruments®) conforme condições descritas a seguir.

Amostras em torno 3,5mg foram pesadas em porta-amostras de alumínio tapados e submetidos à velocidade de aquecimento de 10°C/min no intervalo de temperaturas de 25°C a 250°C, sob atmosfera de nitrogênio.

#### *Microscopia Eletrônica de Varredura*

A morfologia das amostras de BNZ recristalizado foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura [MEV] utilizando um microscópio de marca JEOL JSM-5510. As amostras foram previamente recobertas com grafita.

### *Difração de raios-X*

Ensaio de difração de raios-X foram realizados em amostras de BNZ recristalizado utilizando um difratômetro XRD6000 (Shimadzu<sup>®</sup>), equipado com tubo de ferro e monocromador de grafite. As medidas foram realizadas entre 2 e 60° 2θ com velocidade de 2° 2θ/min.

### **3.2.3. Estudos de compatibilidade térmica fármaco-excipiente**

#### *3.2.3.1. Preparo das amostras*

A compatibilidade do BNZ frente a diferentes excipientes foi realizada utilizando misturas físicas binárias de fármaco-excipiente preparadas na proporção de 1:1(p/p). Algumas amostras foram submetidas a envelhecimento através do armazenamento a 80°C durante 10 minutos em uma termobalança modelo Eurotherm (Gibertini<sup>®</sup>).

#### *3.2.3.2. Calorimetria exploratória diferencial [DSC]*

As amostras foram analisadas conforme descrito no item 2.2.5.

#### *3.2.3.3. Espectroscopia no infravermelho*

Espectros de infravermelho com transformada de Fourier [FTIR] foram obtidos utilizando um espectrômetro modelo MB100 (Bomem<sup>®</sup>), empregando um intervalo de varredura de 400-4.000cm<sup>-1</sup> com resolução de 4cm<sup>-1</sup>. As amostras foram compactadas em prensa hidráulica com KBr.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Estudo de polimorfismo cristalino

Os solventes selecionados para o estudo e a concentração de BNZ obtida com cada um deles encontram-se descritos na tabela 3.1. Para utilizar os solventes 1-octanol, isopropanol e acetato de etila, foi necessário aquecer o sistema a 60°C, a fim de obter soluções de BNZ em concentrações razoáveis para o ensaio.

**Tabela 3. 1: Solventes empregados no preparo de soluções de BNZ para os ensaios de cristalização.**

Solventes	Polaridade <sup>a</sup>	Aquecimento	Solubilidade do BNZ a 25°C <sup>b</sup> (mg/mL)
Dimetilsulfóxido	1,00	Não	>500
Dimetilformamida	0,88	Não	>480
Metanol	0,60	Não	13,08±2,24
Acetona	0,71	Não	30,55±0,25
Acetonitrila	0,75	Não	24,74±2,86
1-octanol	0,40	Sim	0,53±0,02
Isopropanol	0,48	Sim	1,94±0,13
Acetato de etila	0,55	Sim	3,55±0,09

<sup>a</sup> De acordo com GU et al., 2004; <sup>b</sup> De acordo com ensaio de solubilidade (Tabela 2.2)

O BNZ apresenta uma solubilidade muito elevada nos solventes dimetilsulfóxido e dimetilformamida, e quantidades próximas a saturação nestes solventes tornaria inviável o processo, devido à precipitação maciça de fármaco pelos métodos testados e devido à elevada quantidade de princípio ativo despendida. Optou-se, portanto em utilizar uma concentração moderada de BNZ (20mg/mL) para esses solventes. Os resultados de obtenção de cristais nas diferentes condições avaliadas encontram-se descritas na tabela 3.2.

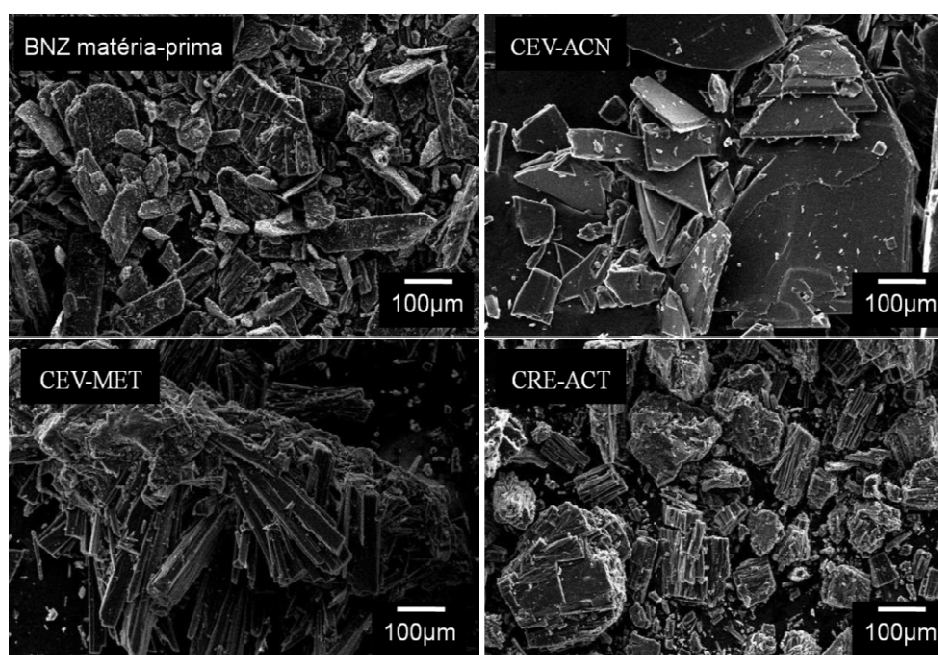
Observa-se que para as soluções de BNZ preparadas com dimetilsulfóxido e dimetilformamida houve recristalização imediata pelo método de adição do anti-solvente, no entanto, para as condições cristalização por evaporação e resfriamento do solvente, que exigem concentrações próximas a saturação, não ocorreu formação de cristais. Também não foi observado crescimento cristalino nas soluções obtidas com os solventes 1-octanol, isopropanol e acetato de etila pelo método de adição do anti-solvente devido ao falta de miscibilidade destes solventes com a água.

**Tabela 3. 2: Formação de cristais nas diferentes condições de cristalização.**

Solventes	Condições de cristalização		
	CAA	CEV	CRE
Dimetilsulfóxido	+	-	-
Dimetilformamida	+	-	-
Metanol	+	+	+
Acetona	+	+	+
Acetonitrila	+	+	+
1-octanol	-	+	-
Isopropanol	-	+	+
Acetato de etila	-	+	+

Sendo, CAA = cristalização por adição de anti-solvente; CEV = cristalização por evaporação do solvente; CRE = cristalização por resfriamento; + indicativo de formação de cristais e - indicativo de ausência de cristalização.

As fotomicrografias das amostras de BNZ recristalizado, obtidas nas diferentes condições de ensaio, mostraram grande variabilidade granulométrica, fornecendo indícios de possíveis mudanças no hábito cristalino acicular do BNZ. Algumas fotomicrografias selecionadas são mostradas na figura 3.1.



**Figura 3. 1: Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos cristais de BNZ obtidos em algumas condições de recristalização: BNZ original; CEV-ACN = cristalização por evaporação do solvente acetonitrila; CEV-MET = cristalização por evaporação do solvente metanol; CRE-ACT = cristalização por resfriamento do solvente acetona. Aumento 130X.**

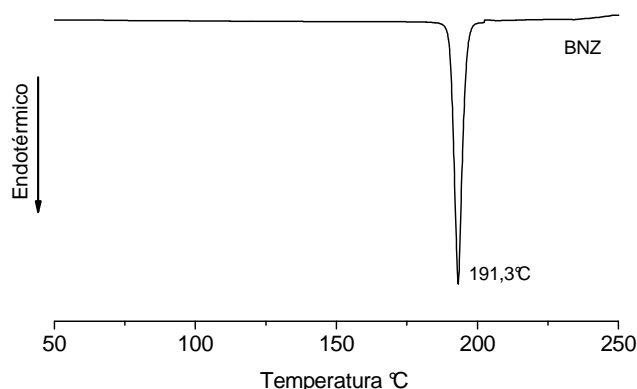
Por meio da caracterização térmica das amostras recristalizadas foram avaliadas modificações relacionadas à fusão do fármaco e ao aparecimento de eventos térmicos atípicos para esse composto (Tabela 3.3).

**Tabela 3. 3: Dados térmicos do BNZ recristalizado nas diferentes condições de cristalização obtidos por DSC.**

Condição de cristalização	Solvente	Intervalo de fusão (°C)	T <sub>max</sub> <sup>a</sup> (°C)	ΔH (J/g)	T <sub>onset</sub> <sup>b</sup> (°C)	Outros eventos térmicos inesperados
<b>BNZ</b>	-	<b>185,00-201,48</b>	<b>191,30</b>	<b>138,6</b>	<b>190,39</b>	<b>Não</b>
CAA	ACN	185,83-199,30	192,32	139,80	190,15	Não
	ACT	185,60-199,53	192,90	122,60	190,62	Não
	DMF	184,03-200,43	193,17	77,56	190,83	Não
	DMSO	183,35-199,75	192,74	61,52	190,22	Não
	MET	184,03-197,96	191,78	172,90	189,86	Não
CEV	<b>ACE</b>	<b>183,35-197,73</b>	<b>191,03</b>	<b>147,30</b>	<b>189,90</b>	<b>Sim</b>
	ACN	184,03-197,28	191,68	91,42	190,34	Não
	ACT	185,60-197,28	191,29	159,50	190,10	Não
	ISO	182,46-197,28	191,76	117,20	190,04	Não
	MET	173,25-199,30	191,89	151,40	190,22	Não
CRE	<b>OCT</b>	<b>184,03-196,38</b>	<b>191,61</b>	<b>87,51</b>	<b>190,11</b>	<b>Sim</b>
	ACE	183,20-198,40	192,71	95,84	190,27	Não
	<b>ACN</b>	<b>189,19-196,83</b>	<b>191,45</b>	<b>118,90</b>	<b>190,58</b>	<b>Sim</b>
	ACT	184,48-201,32	193,60	141,10	190,82	Não
	ISO	180,88-197,28	192,31	114,40	189,66	Não
	MET	186,50-199,98	193,68	118,80	190,79	Não

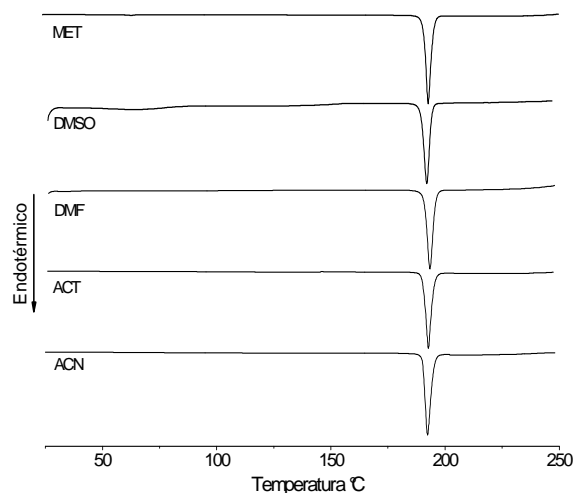
<sup>a</sup> calculada a partir da altura máxima atingida pelo pico desde a linha de base, convencionou-se como a temperatura de fusão da amostra. <sup>b</sup> calculada a partir do ponto de intersecção da tangente traçada a partir da extrapolação da linha de base.

A curva de DSC típica para o BNZ, representada na figura 3.2, mostrou um único evento endotérmico relacionado à fusão do fármaco a temperatura de 191,3°C (T<sub>max</sub>) com variação de entalpia de ΔH<sub>fusão</sub> = -138,6J/g.

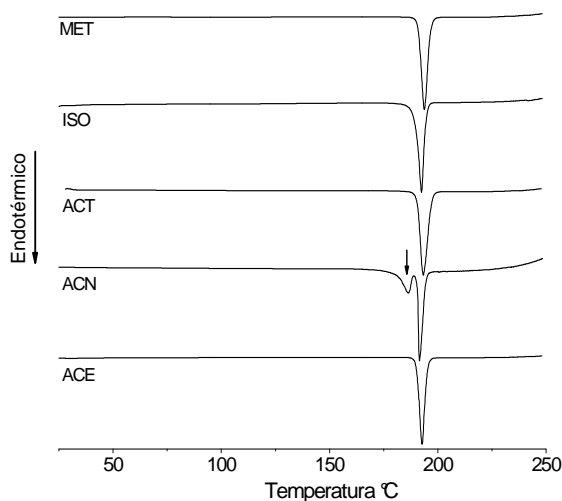


**Figura 3. 2: Curva de DSC típica do BNZ.**

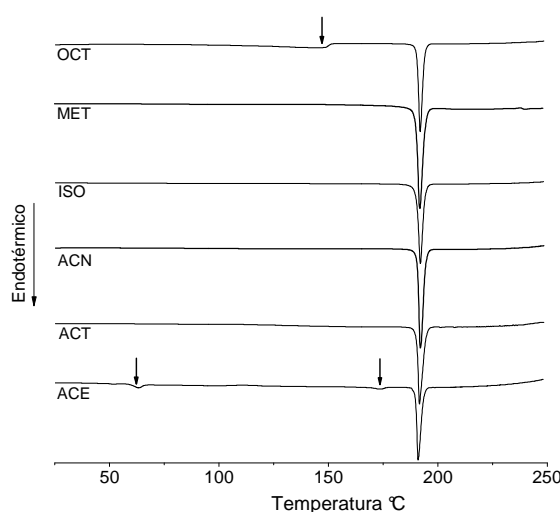
Nota-se que, em geral, as curvas de DSC obtidas nas diferentes condições de cristalização (Figuras 3.3, 3.4 e 3.5) não revelaram alterações significativas no pico de fusão do fármaco nas amostras recristalizadas em relação ao pico original do BNZ.



**Figura 3. 3: Curvas de DSC do BNZ recristalizado pelo método de cristalização pela adição de anti-solvente [CAA].** Sendo, MET = metanol; DMSO = dimetilsulfóxido; DMF = dimetilformamida; ACN = acetonitrila; ACT = acetona.



**Figura 3. 4: Curvas de DSC do BNZ recristalizado pelo método de cristalização por resfriamento do solvente [CRE].** Sendo, MET = metanol; ISO = isopropanol; ACN = acetonitrila; ACT = acetona; ACE = acetato de etila.



**Figura 3. 5: Curvas de DSC do BNZ recristalizado pelo método de cristalização pela evaporação do solvente [CEV].** Sendo, OCT = octanol; MET = metanol; ISO = isopropanol; ACN = acetonitrila; ACT = acetona; ACE = acetato de etila.

Uma pequena oscilação nas temperaturas de fusão ( $T_{max}$ ) foi verificada para algumas amostras avaliando-se os dados na tabela 3.3. Esta variação de 1 a 2°C pode ser explicada pela assimetria do pico observada no início da fusão, e que é corrigida nos valores de  $T_{onset}$  (Tabela 3.3). Dessa forma, ao contrário do que foi observado na análise por MEV, as variações nos dados de DSC não parecem indicar o aparecimento de uma nova fase cristalina de BNZ para a maior parte das amostras recristalizadas.

Contudo, observou-se nas amostras recristalizadas CEV-ACE, CEV-OCT e CRE-ACN a aparição de outros eventos térmicos não previstos, em destaque nas figuras 3.4 e 3.5.

Esses eventos térmicos encontram-se descritos detalhadamente na tabela 3.4 e sugerem um possível aparecimento de formas polimórficas de BNZ.

**Tabela 3. 4: Dados térmicos dos outros eventos observados no DSC do BNZ recristalizado em diferentes condições.**

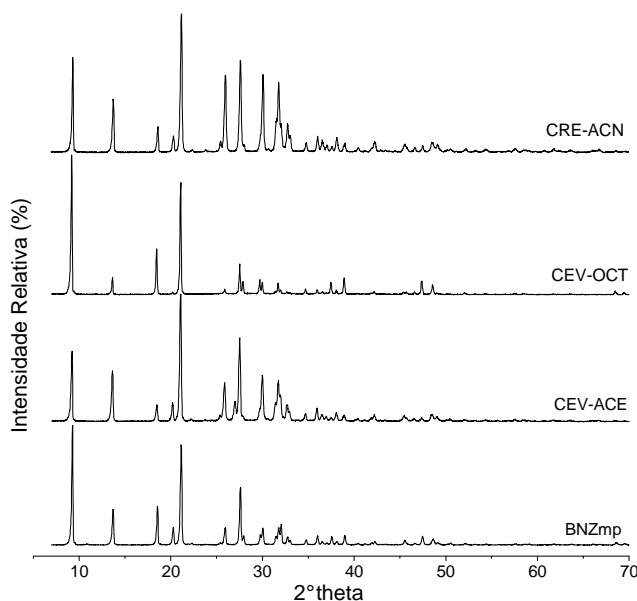
Amostra*	Faixa do evento (°C)	$\Delta H$ (J/g)
CEV-ACE	57,33-67,22	11,08
	167,63-177,51	6,32
CEV-OCT	140,47-150,93	-
CRE-ACN	169,43-188,97	56,35

\*Onde CEV-ACE corresponde ao BNZ obtido por evaporação de acetato de etila, CEV-OCT corresponde ao BNZ recristalizado a partir da evaporação do 1-octanol e CRE-ACN, indica BNZ obtido por resfriamento da acetonitrila



Apesar das técnicas térmicas serem consideradas ferramentas de grande utilidade para uma triagem inicial de possíveis polimorfos, o DSC não fornece uma avaliação conclusiva sobre a existência de polimorfos. De modo a obter uma avaliação mais precisa quanto à pureza física das amostras de BNZ obtidas por CEV-ACE, CEV-OCT e CRE-ACN, uma caracterização utilizando difratometria de raios-X do pó foi realizada.

Na figura 3.6, verificam-se algumas mudanças nas intensidades relativas dos picos de BNZ recristalizado, quando comparado com seu difratograma da matéria-prima original. Com destaque para o BNZ cristalizado por evaporação do 1-octanol [CEV-OCT]. Essas variações parecem indicar diferenças de crescimento cristalino que propiciaram um efeito de orientação preferencial dos cristais durante o ensaio.



**Figura 3. 6: Difratogramas de raios-X do pó obtidos a partir do BNZ recristalizado.** Amostras de BNZ matéria prima [BNZmp] e BNZ recristalizado por CRE-ACN; CEV-OCT e CEV-ACE.

Uma análise mais detalhada empregando os dados de BNZ monocristalino (SOARES-SOBRINHO et al., 2008) indica que a posição de todos os picos são justificadas pela forma cristalina referenciada. Desta forma, pode-se concluir com um grau elevado de segurança, que todas as amostras de BNZ recristalizado obtidas nas condições deste estudo possuem a mesma célula cristalina unitária do BNZ original.

### 3.3.2. Estudos de compatibilidade térmica fármaco-excipiente

Os excipientes são tradicionalmente utilizados em formulações farmacêuticas como componentes inertes, embora exerçam uma grande influência na biodisponibilidade do medicamento. Algumas interações físicas entre fármaco e excipiente, como complexações, adsorções ou formação de dispersões sólidas, podem melhorar a eficácia e estabilidade de inúmeros fármacos (JACKSON et al., 2000). Contudo, interações químicas podem comprometer a integridade do princípio ativo, reduzindo sua efetividade ou mesmo provocando efeitos tóxicos.

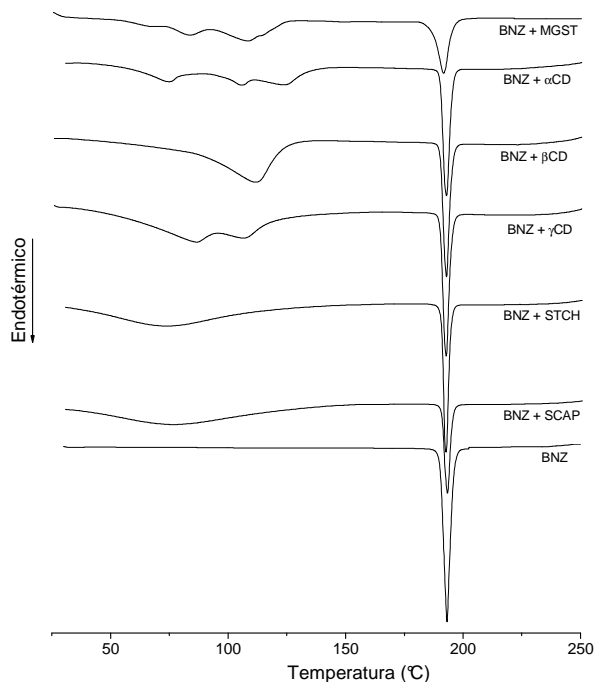
Para determinar a existência de incompatibilidades entre o fármaco BNZ e alguns excipientes farmacêuticos selecionados neste estudo, as curvas de DSC das misturas físicas fármaco-excipiente foram comparadas com as curvas de seus componentes individuais, e mudanças no perfil térmico típico do BNZ ou dos excipientes foram interpretadas como uma interação que pode estar ou não relacionada a uma incompatibilidade química entre o fármaco e o excipiente estudado (CUNHA-FILHO et al., 2007).

A curva de DSC do BNZ apresentou um perfil característico de uma substância anidra e cristalina com um pico de fusão bem definido, que foi utilizado como padrão de comparação (Figura 3.2). O acompanhamento da fusão do fármaco nas misturas físicas estudadas está detalhado na tabela 3.5 e as modificações nesse evento térmico estão destacadas.

**Tabela 3. 5: Dados térmicos obtidos por DSC do evento de fusão do BNZ nas diferentes misturas físicas estudadas.**

<b>Amostra</b>	<b>Intervalo de fusão (°C)</b>	<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>	<b>ΔH (J/g)</b>
<b>BNZ</b>	<b>185,0-201,5</b>	<b>191,3</b>	<b>138,6</b>
<b>BNZ+HEC</b>	<b>179,8-195,4</b>	<b>190,5</b>	<b>50,7</b>
<b>BNZ+PEG</b>	<b>147,5-193,4</b>	<b>180,5</b>	<b>41,9</b>
BNZ + MGST	181,0-200,0	191,2	54,7
BNZ+STCH	187,0-196,6	192,0	66,4
BNZ+SCAP	187,4-197,5	192,6	45,1
BNZ+αCD	186,6-198,4	192,2	74,9
BNZ+βCD	184,7-198,5	192,2	75,9
BNZ+γCD	186,8-197,9	192,1	79,3
<b>BNZ+HPβCD</b>	<b>174,4-198,0</b>	<b>191,2</b>	<b>73,2</b>

De acordo com os resultados, a maioria das misturas binárias (Figura 3.7) não apresentou variações significativas no perfil térmico do BNZ em relação aos valores originais. Enquanto que variações observadas nos intervalos de fusão e valores de entalpia para as amostras BNZ+HEC, BNZ+PEG e BNZ+HP $\beta$ CD sugeriram uma provável interação entre os componentes constituintes de cada mistura binária.



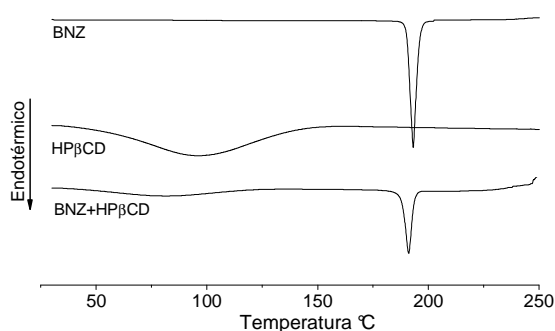
**Figura 3. 7: Curvas de DSC do BNZ e das misturas físicas que não apresentaram variação no perfil térmico do BNZ.** Sendo, BNZ = benznidazol; MGST = estearato de magnésio;  $\alpha$ CD =  $\alpha$ -ciclodextrina;  $\beta$ CD =  $\beta$ -ciclodextrina;  $\gamma$ CD =  $\gamma$ -ciclodextrina; STCH = amido pré-gelatinizado Starch 1500<sup>®</sup> e SCAP = amido pré-gelatinizado Starcap 1500<sup>®</sup>.

Os valores de entalpia variam proporcionalmente com o conteúdo de fármaco contido nas amostras. Oscilações com respeito a esse parâmetro são esperadas devido à falta de uniformidade de conteúdo em amostras muito reduzidas como as utilizadas nesse ensaio de DSC (aproximadamente 4mg). Entretanto, três das misturas físicas avaliadas, BNZ+HEC, BNZ+PEG e BNZ+HP $\beta$ CD apresentam mudanças significativas em relação à curva de fusão do fármaco.

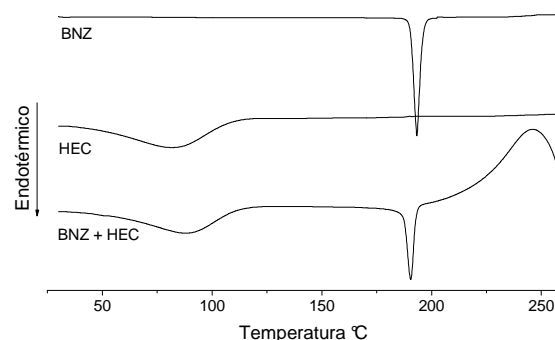
Para misturas físicas contendo ciclodextrinas, desvios nos perfis térmicos de DSC são frequentemente reportados. Esses excipientes são oligossacarídeos cíclicos contendo uma cavidade lipofílica que pode formar complexos de inclusão com diferentes fármacos, melhorando sua solubilidade, dissolução e estabilidade (LOFTSSON et al., 2007). O

aquecimento durante o ensaio de DSC pode favorecer esse fenômeno e desvios nos perfis térmicos das amostras são interpretados como uma evidência de formação de complexos de inclusão. No caso da mistura BNZ+HP $\beta$ CD houve um alargamento do pico de fusão do fármaco, com um intervalo de fusão de 23°C contra 16,5°C, faixa de fusão do BNZ original (Tabela 3.5, Figura 3.8). Esse comportamento está de acordo com a literatura e constitui uma interação física desejável, tendo em vista sua utilização como agente solubilizante do BNZ.

O perfil térmico do excipiente HEC revelou um pico endotérmico largo atribuído à perda de água adsorvida (Figura 3.9).



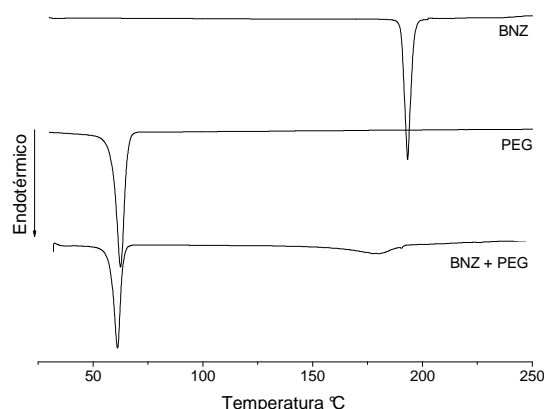
**Figura 3. 8: Curvas de DSC do BNZ, HP $\beta$ CD e da mistura física, BNZ+HP $\beta$ CD.**



**Figura 3. 9: Curvas de DSC do BNZ, HEC, da mistura física, BNZ+HEC.**

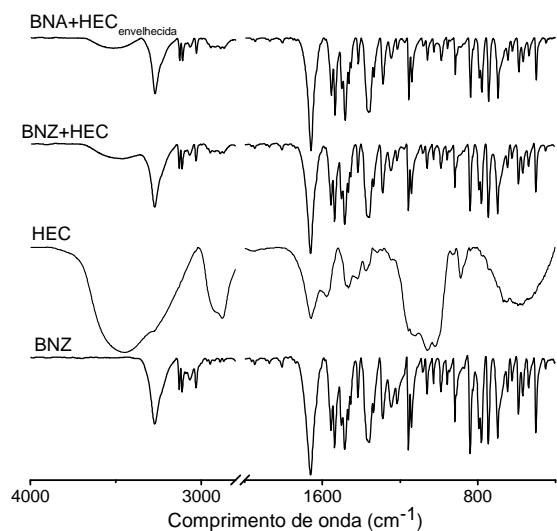
A mistura física BNZ + HEC apresentou uma variação na posição do pico de fusão do fármaco para temperaturas inferiores, ou seja, o intervalo de fusão que se inicia a 179,8°C e termina a 195,4°C. De acordo com a figura 3.9, nota-se também um pico exotérmico não existente anteriormente, que pode estar relacionado a uma antecipação da temperatura de degradação do fármaco. Essas evidências apresentadas sugerem uma interação entre esses componentes.

Para a mistura de BNZ + PEG, as curvas de DSC revelaram alterações com relação aos perfis individuais de ambos os componentes da mistura (Figura 3.10). O PEG apresenta um pico endotérmico de fusão a 62°C. Na mistura física desse excipiente com o BNZ, houve um deslocamento da fusão do PEG para temperaturas inferiores. Nessa mistura, o perfil térmico de fusão do BNZ apresentou-se completamente descaracterizado, com acentuado alargamento do pico, mostrando um deslocamento superior a 10 °C ( $T_{\text{max}} = 180,5^{\circ}\text{C}$ ) e uma redução de entalpia ( $\Delta H_{\text{fusão}} = 41,9\text{J/g}$ ) o que pode estar relacionado à solubilização do BNZ no PEG fundido ou à interação entre esses dois produtos (Tabela 3.5).

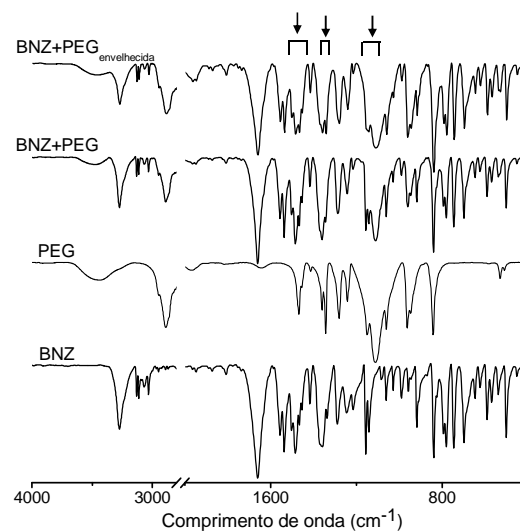


**Figura 3. 10: Curvas de DSC do BNZ, PEG e da mistura BNZ+PEG.**

De forma a investigar a repercussão química das interações nas misturas físicas de BNZ com PEG e com HEC observadas por DSC, empregou-se a técnica de FTIR. Optou-se por utilizar nessa análise, misturas físicas envelhecidas, de forma a tornar mais evidentes possíveis fenômenos de decomposição. Os espectros de FTIR das substâncias isoladas e combinadas em misturas binárias recém preparadas e envelhecidas são mostrados nas figuras 3.11 e 3.12.



**Figura 3. 11: Espectro de FTIR do BNZ, HEC e suas respectivas misturas físicas recém-preparadas e após envelhecimento.**



**Figura 3. 12: Espectro de FTIR do BNZ, PEG e suas respectivas misturas físicas recém-preparadas e após envelhecimento.**

O estresse térmico, ao qual os produtos foram submetidos, não foi suficiente para iniciar qualquer degradação significativa nesses materiais separadamente. No caso das misturas físicas envelhecidas contendo BNZ+HEC (Figura 3.11), nenhuma alteração nas

bandas de grupos funcionais foi detectada. Este resultado atesta que as interações sugeridas pelos ensaios de DSC entre o BNZ e o HEC não comprometem a integridade química desses componentes. Portanto, o BNZ pode ser considerado compatível com o HEC e esse polímero poderá ser recomendado como excipiente para formulações contendo BNZ a serem desenvolvidas neste trabalho.

Contudo, um resultado diferente é encontrado para as amostras contendo PEG. A figura 3.12 aponta mudanças no formato e na intensidade relativa das bandas correspondentes ao grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) do BNZ ( $1342$  e  $1485 \text{ cm}^{-1}$ ) na mistura física BNZ+PEG envelhecida. Também foi observado nessa amostra, o quase desaparecimento da banda correspondente a ligação N-H e a deformação axial de C-N do grupo amida a  $1157 \text{ cm}^{-1}$ . Estas alterações encontradas pela análise por FTIR sugerem uma possível degradação do fármaco. Desta maneira, recomenda-se avaliar criteriosamente a utilização do PEG em formulações contendo BNZ e sendo possível deve-se evitar seu uso, a fim de se impedir prejuízos à ação do fármaco e à formulação.

### 3.4. CONCLUSÃO

A consistência cristalina do BNZ foi colocada a prova após vários experimentos de recristalização por diferentes condições e empregando solventes variados. Os resultados evidenciaram que, mesmo após diversos ensaios de crescimento cristalino, a mesma forma cristalina original monoclinica do BNZ foi encontrada durante o estudo. Pode-se inferir que os cristais de BNZ possuem uma célula unitária bastante estável, o que faz pensar que o polimorfismo não será uma preocupação durante a síntese ou o processamento farmacêutico desse produto.

Pode-se concluir que o BNZ é compatível com os excipientes STCH, SCAP, MGST,  $\alpha\text{CD}$ ,  $\beta\text{CD}$ , e  $\gamma\text{CD}$  e que esses podem ser usados com segurança em formas farmacêuticas a base desse princípio ativo. No caso do polímero HEC, estudos adicionais utilizando FTIR em amostras envelhecidas não revelaram nenhuma mudança química, validando esse produto para uso em formulações contendo BNZ. Resultado oposto foi observado com o excipiente PEG, cujos dados de FTIR são sugestivos de degradação química do fármaco e que devem ser investigados por outras técnicas mais conclusivas que possam indicar, com maior grau de segurança, a existência de incompatibilidade entre o BNZ e o polímero PEG.

Este capítulo encerra a parte deste trabalho dedicada aos estudos de pré-formulação, que estiveram pautados nos estudos das diferentes propriedades físico-químicas do BNZ, no conhecimento da sua estabilidade cristalina e na seleção dos excipientes mais idôneos, tendo como objetivo o desenvolvimento melhor estruturado das formulações na próxima parte do trabalho, descrita a seguir.

## **PARTE 2:**

*Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas a base de microcristais hidrossolúveis de benznidazol*

---

---

---



---

## Capítulo 4: Micronização do benznidazol pela técnica de recristalização por mudança de solvente

### 4.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas formulações a base de fármacos pouco solúveis como o BNZ é considerado um grande desafio, uma vez que a dissolução limitada pela baixa solubilidade aquosa desses fármacos constitui uma barreira que dificulta o sucesso dessas formulações (AMIDON, 1995; RASENACK et al., 2003).

Assim, o incremento da biodisponibilidade oral do BNZ, através de técnicas que favoreçam sua solubilidade aquosa, poderia reduzir a dose terapêutica efetiva e consequentemente seus efeitos colaterais. Procedimentos de recristalização espontânea do princípio ativo estabilizados por agentes hidrofílicos, em escala nanoparticular ou microparticular, tem sido utilizados recentemente com resultados bastante promissores (CUNHA-FILHO et al., 2008; SARKARI et al., 2002). Esta técnica tem permitido obter materiais com tamanhos de partículas bastante reduzidos, homogêneos e de baixa coesividade conseguindo importantes incrementos na velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis em água, como o ibuprofeno, o cetoconazol e o itraconazol (STECKEL et al., 2003; RASENACK et al., 2004).

O objetivo desta etapa do trabalho foi preparar e caracterizar microcristais de benznidazol obtidos pela técnica de recristalização por mudança de solvente, e posteriormente incorporá-las em comprimidos de liberação imediata.

### 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.2.1. Materiais

Benznidazol [BNZ] lote 13871 fornecido pela Roche. Polímeros doados pela Colorcon<sup>®</sup>: Hidroxipropilmetilcelulose Methocel<sup>®</sup> F50 Premium LV [HPMC<sub>F50</sub>], Methocel<sup>®</sup> K100 Premium LV [HPMC<sub>K100</sub>], Methocel<sup>®</sup> E10m Premium LV [HPMC<sub>E10m</sub>], Starch 1500<sup>®</sup> [STCH]. Hidroxietilcelulose Cellosize<sup>®</sup> QP 300 [HEC] cedido pela Polytechno<sup>®</sup>, Polietilenoglicol 4000 Carbowax<sup>®</sup> [PEG], Estearato de magnésio [MGST] e Lauril Sulfato de

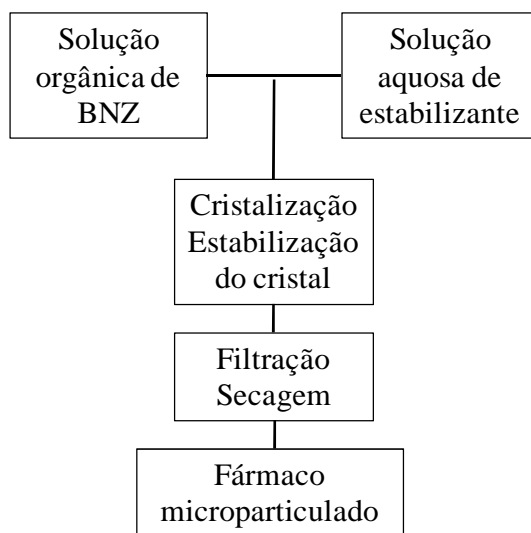
Sódio [LSS] adquirido da Vetec<sup>®</sup>. Todos os solventes utilizados no estudo foram de grau analítico.

#### 4.2.2. Obtenção de microcristais hidrossolúveis a base de benznidazol

##### 4.2.2.1. Otimização das condições experimentais de recristalização por mudança de solvente

A obtenção de microcristais de BNZ foi realizada empregando-se a técnica de recristalização por mudança de solvente. Neste procedimento esquematizado na figura 4.1, o fármaco é dissolvido em um solvente orgânico em elevada concentração, enquanto que um agente hidrofílico estabilizante dissolve-se em água. A técnica se baseia na rápida inversão de polaridade da solução que contém o fármaco através da adição da solução aquosa de estabilizante.

A mudança brusca na polaridade do sistema provoca a rápida recristalização do fármaco. As partículas que começam a se formar são instantaneamente revestidas pelo polímero hidrofílico, evitando assim o crescimento cristalino e mantendo-as em escala micrométrica e com distribuição uniforme de tamanhos de partícula.



**Figura 4. 1: Representação esquemática das etapas de obtenção de microcristais de BNZ pelo método de recristalização por mudança de solvente.**

Em uma primeira etapa do trabalho, foram conduzidos ensaios para aprimorar pontos críticos da técnica identificados previamente, tais como: a escolha do agente estabilizante empregado na fase aquosa; a seleção do solvente mais adequado para a fase orgânica; a

influência da temperatura durante a mistura de fases; a definição da proporção mais idônea de mistura de fase orgânica e de fase aquosa (FO:FA); e finalmente, a determinação da concentração ótima de agente estabilizante utilizado na fase aquosa.

A utilidade de diferentes polímeros em propiciar a formação de microcristais de BNZ com elevada velocidade de dissolução foi avaliada através da eficiência de dissolução no tempo de 20 minutos [ED<sub>20</sub>], conforme método descrito em detalhes na próxima seção. Os polímeros testados foram: HPMCF<sub>50</sub>, HPMCE<sub>10m</sub>, HPMCK<sub>100</sub>, PEG e HEC.

A seleção do solvente orgânico baseou-se em sua capacidade em dissolver o BNZ e no rendimento de microcristais conseguido após a mudança de solvente. Os solventes testados foram acetona, metanol e etanol.

A influência da temperatura do sistema durante a mudança de solvente foi verificada através da avaliação do rendimento de microcristais obtidos a 5°C e a 25°C.

Em relação à proporção, FO:FA, quatro condições foram testadas em relação aos rendimentos de microcristais obtidos: 1:0,5; 1:1; 1:4 e 1:8.

Por fim, avaliou-se a concentração ideal dos polímeros utilizados para estabilizar os cristais de BNZ. As concentrações ensaiadas foram 0,1%, 0,01%, 0,05% e 0,005%. Para esse parâmetro foram testadas não apenas o rendimento de microcristais, mas também a ED<sub>20</sub>.

Cada parâmetro estudado teve seus experimentos realizados em triplicata, enquanto as demais variáveis foram mantidas constantes, conforme procedimento descrito em detalhes no próximo item.

#### *4.2.2.2. Condições experimentais da recristalização por mudança de solvente em escala de bancada*

Lotes de 200mg de microcristais de BNZ foram obtidos a partir da mistura de uma solução de fármaco dissolvido em acetona a 25mg/mL, com uma solução aquosa de polímeros estabilizantes na concentração de 0,1%. Os microcristais formados foram recuperados por filtração utilizando membrana de 0,45µm, e posteriormente foram secos em estufa de circulação de ar a 37°C por até 24h. O produto obtido foi armazenado em dessecador contendo sílica anidra.

#### 4.2.2.3. *Transposição da escala produtiva*

Terminada a etapa de otimização de metodologia, realizou-se a ampliação da escala de produção dos microcristais de BNZ com o objetivo de elaborar comprimidos e testá-los em modelos animais.

Lotes de 50g de microcristais preparados a partir dos polímeros selecionados, HEC e PEG, foram produzidos realizando-se os ajustes metodológicos necessários. Nessa fase, foram feitos ensaios de doseamento e de perfil de dissolução com o objetivo de assegurar a manutenção das propriedades de solubilização dos microcristais. Os microcristais obtidos foram denominados BNZ<sub>HEC</sub>, para os microcristais obtidos a partir do polímero HEC; e BNZ<sub>PEG</sub>, para aqueles obtidos a partir do polímero PEG.

#### 4.2.2.4. *Ensaio de caracterização físico-química e reológica dos microcristais de benznidazol*

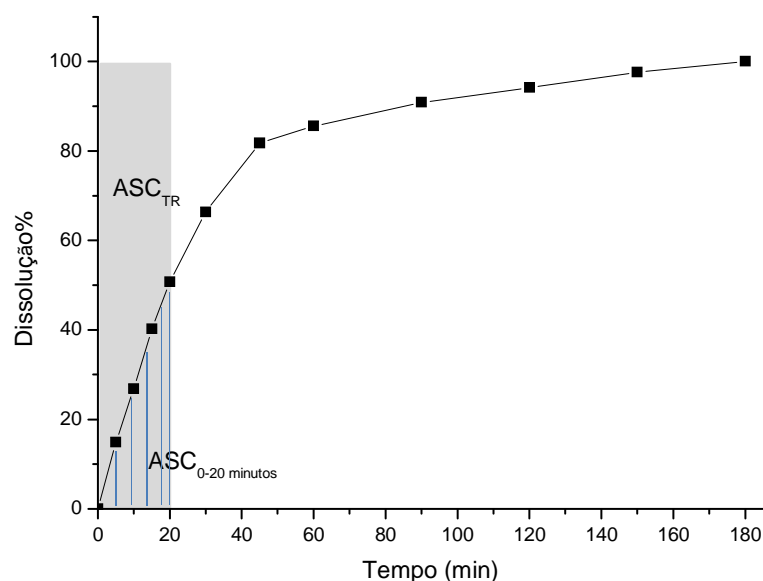
##### *Doseamento dos microcristais*

O teor de BNZ nos microcristais foi obtido através de metodologia espectrofotométrica validada previamente descrita em detalhes no capítulo 1 desta dissertação. As determinações foram realizadas em triplicata.

##### *Perfil de dissolução*

Os perfis de dissolução foram conduzidos em dissolutor modelo 299 (Nova Ética<sup>®</sup>), em condições *Sink*, utilizando 900mL de meio gástrico simulado pH 1,2 (USP 30, 2008) a 37±1°C, aparato 1 (cesta) e rotação de 75 rpm. As amostras de microcristais de BNZ, contendo o equivalente a 50mg de fármaco, foram colocadas em cápsulas gelatinosas duras. O ensaio foi realizado em triplicata. A quantificação do BNZ foi conduzida por metodologia espectrofotométrica validada a 324nm.

A avaliação dos perfis de cada amostra foi realizada pelo cálculo da eficiência de dissolução a 20 minutos [ED<sub>20</sub>] através do método dos trapezóides proposto por Khan e Rhodes (1975), representado pela figura 4.2.



**Figura 4. 2: Representação esquemática método dos trapezóides proposto por Khan e Rhodes (1975).**  $ASC_{0-20\text{minutos}}$  indica a área sob a curva de dissolução no intervalo de tempo de 0-20 minutos; e  $ASC_{TR}$  é a área total do retângulo.

A  $ED_{20}$  foi calculada a partir da razão entre a área sob a curva [ASC] de dissolução dos microcristais no intervalo de tempo de 0-20 minutos [ $ASC_{0-20\text{minutos}}$ ] e a área total do retângulo [ $ASC_{TR}$ ] definido pelo eixo y (valor máximo correspondente a 100% de dissolução) e pelo eixo x (intervalo de tempo igual a 20 minutos) conforme equação descrita a seguir:

$$ED_{20} = \frac{ASC_{0-20}}{ASC_{RT}} \times 100 \quad \text{Equação (4.1)}$$

Os valores de  $ED_{20}$  obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (KHAN; RHODES, 1975). Para o tratamento estatístico dos valores de  $ED_{20}$  aplicou-se ANOVA simples e para determinar diferenças entre as médias obtidas aplicou-se o teste de diferença mínima significativa.

#### Ensaio de solubilidade

Uma avaliação da solubilidade dos microcristais foi realizada com o intuito de verificar alguma modificação do valor obtido para a solubilidade do BNZ. Os experimentos foram conduzidos como apresentado no item 2.2.2.

#### Superfície específica e densidade real dos microcristais

Tanto a área superficial específica quanto a densidade real dos microcristais de BNZ foram determinadas pelas mesmas técnicas já descritas para o BNZ nos itens 2.2.7 e 2.2.8.

#### Perfil térmico dos microcristais

O comportamento térmico dos microcristais de BNZ foi estudado por DSC nas condições descritas no item 2.2.5.

#### Análise por difração de raios-X

Os perfis difratométricos dos microcristais podem fornecer informações úteis sobre a pureza cristalina ou possíveis alterações na fase cristalina devido ao processo de cristalização obtido pelo emprego da técnica de recristalização por mudança de solvente. Por isso, ensaios de difração de raios-X do pó foram conduzidos de acordo com o no item 2.2.6.

#### Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos microcristais de BNZ foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, conforme descrito no item 2.2.9.

#### Medidas reológicas dos microcristais

Com o intuito de comparar as características de fluxo dos microcristais de BNZ, com as características dos cristais de BNZ originais, os ensaios reológicos foram conduzidos conforme procedimento exposto no item 2.2.10.

#### Rendimento do processo de recristalização

O rendimento no processo de recristalização foi calculado a partir da massa inicial de benznidazol utilizada para o preparo da solução orgânica ( $M_i$ ) e da massa de benznidazol obtida após a rescritalização ( $M_o$ ), empregando a seguinte equação:

$$R (\%) = \frac{M_o}{M_i} \times 100 \quad \text{Equação (4.2)}$$

Onde, R representa o rendimento do processo de microprecipitação em porcentagem.

#### 4.2.3. Obtenção dos comprimidos a base de microcristais de benznidazol

Quatro formulações foram delineadas para a obtenção de comprimidos contendo o equivalente a 100mg de BNZ (dose de fármaco disponível comercialmente). O método de compressão utilizado foi compressão prévia a granulação por via seca.

Lotes de granulados equivalentes a 20g de BNZ foram preparados em presença e ausência do tensoativo LSS. Os demais excipientes usados para a produção dos comprimidos foram: Starch 1500<sup>®</sup> (amido pré-gelatinizado) e estearato de magnésio. A composição das formulações está disposta na tabela 4.1.

**Tabela 4. 1: Composição das formulações a base de microcristais de BNZ.**

Formulação	Microcristais de BNZ (%)	STCH (%)	MGST (%)	LSS (%)	Proporção PA:excipiente
F1BNZ <sub>HEC</sub>	33,3	66,4	0,3	-	1:2
F2BNZ <sub>HEC</sub>	33,3	65,4	0,3	1,0	1:2
F1BNZ <sub>PEG</sub>	33,3	66,4	0,3	-	1:2
F2BNZ <sub>PEG</sub>	33,3	65,4	0,3	1,0	1:2

Funções farmacotécnicas: HEC e PEG = agente estabilizante; STCH = diluente e desintegrante; MGST = lubrificante e LSS = agente solubilizante.

As formulações simples, sem LSS foram denominadas por F1 e as formulações preparadas com esse agente tensoativo, receberam a nomenclatura F2.

A mistura dos componentes da formulação foi realizada em um misturador em “V” por 15 minutos. Em seguida, briquetes de 16mm foram preparados com auxílio de uma compressora Primel (FABBE<sup>®</sup>), granulados em malha de 1,5mm e calibrados em malha de 0,35mm utilizando granulador oscilante (FABBE<sup>®</sup>). O granulado obtido foi caracterizado quanto a sua reologia, conforme descrito anteriormente e comprimido utilizando-se um punção de 10mm do tipo circular côncavo.

#### 4.2.3.1. Controle de qualidade dos comprimidos

As formulações elaboradas passaram por testes farmacopéicos recomendados pela Farmacopéia Brasileira IV edição e pela USP 30 e encontram-se descritos a seguir.

##### Características organolépticas

As características organolépticas foram determinadas através de aspectos sensoriais observando-se as seguintes especificações relativas à forma, cor e odor.

- Forma: comprimido circular e convexo.
- Odor: inodoro
- Cor: levemente amarelado

##### Peso médio

Visando verificar a uniformidade de peso nos lotes de comprimidos produzidos, foram amostrados 20 comprimidos de cada formulação e seus pesos médios foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O critério de aceitação adotado estabelece uma variação máxima de  $\pm 5\%$  sobre o peso teórico (F. BRAS. IV, 1988).

##### Doseamento

A dose teórica de BNZ em todas as formulações de comprimidos produzidas foi de 100mg. Para o doseamento, 10 comprimidos foram triturados e a quantidade equivalente ao peso médio dos comprimidos foi pesada. As amostras foram inicialmente dissolvidas em metanol e submetidas a banho de ultrassom por 15 minutos. As diluições foram realizadas em solução de metanol:água (1:1 v/v). O ensaio foi conduzido em triplicata e as soluções foram quantificadas utilizando metodologia espectrofotométrica previamente validada descrita no capítulo 1. Os resultados foram avaliados dentro da faixa de aceitação de 95 e 105% (F. BRAS. IV, 1988).



### Dureza

A capacidade de resistência dos comprimidos ao esmagamento ou ruptura sob pressão foi determinada pelo ensaio de dureza. Para isso, 10 comprimidos de cada formulação foram submetidos à ação de um durômetro OFF-TEC (Galileo<sup>®</sup>) dotado de mola em espiral. O limite mínimo de aceitação é de 3Kgf (F. BRAS. IV, 1988).

### Friabilidade

A avaliação da resistência dos comprimidos a abrasão quando submetidos à ação mecânica foi obtida pelo teste de friabilidade. Para cada formulação, 10 comprimidos de peso conhecido foram colocados em um friabilômetro (Ética<sup>®</sup>) ajustado para realizar 100 rotações em cinco minutos. O peso dos comprimidos antes ( $P_i$ ) e após as rotações ( $P_f$ ) foi registrado.

A friabilidade (F) foi expressa em porcentagem (%) de acordo com a equação que se segue:

$$F(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \quad \text{Equação (4.3)}$$

Foram considerados aceitos os comprimidos com perda inferior a 1,5% do seu peso (F. BRAS. IV, 1988).

### Desintegração

O ensaio de desintegração permite verificar o tempo de desintegração de comprimidos ou cápsulas sob condições específicas em um aparelho adequado ao teste. Foram amostrados 6 comprimidos por formulação e o experimento foi realizado em um desintegrador Ética<sup>®</sup>, utilizando-se água a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  como meio de desintegração. Os comprimidos deveriam desintegrar completamente em até 30 minutos (F. BRAS. IV, 1988).

### Perfil de Dissolução

As condições do ensaio de dissolução para os comprimidos obtidos a partir de microcristais de BNZ foram: pás, como aparato de agitação, 900mL de meio gástrico simulado (USP 30, 2008), rotação de 75rpm e temperatura mantida a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Como critério

de aprovação para comprimidos de liberação imediata, as formulações deveriam alcançar 85% de dissolução em 30 minutos (FDA, 2000). Nesse ensaio, optou-se por acompanhar todo o perfil de dissolução dos comprimidos, de forma a conseguir mais subsídios experimentais para a comparação entre as formulações. As eficiências de dissolução das formulações delineadas neste estudo foram comparadas com a eficiência de dissolução do medicamento de referência contendo BNZ, Rochagan<sup>®</sup>, produzido pela Roche. O cálculo das ED<sub>20</sub> seguiu metodologia descrita no item 4.2.2.4 deste capítulo.

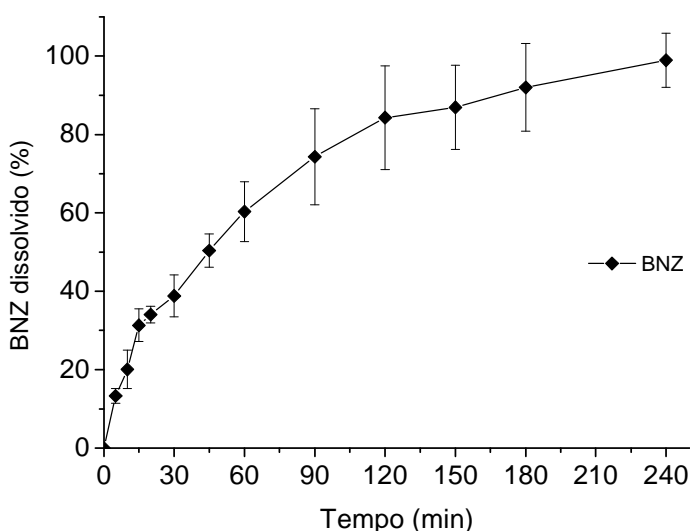
### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Obtenção de microcristais hidrossolúveis de benznidazol

##### 4.3.1.1. Otimização das condições experimentais de recristalização por mudança de solvente

Analisando, inicialmente, o perfil de dissolução do BNZ matéria-prima, observou-se uma velocidade de dissolução bastante lenta, com ED<sub>20</sub> de apenas 20,7 (± 2,3) (Figura 4.3).

De acordo com esse perfil, realizado em condições *Sink*, são necessárias quatro horas para alcançar aproximadamente 100% de fármaco dissolvido.



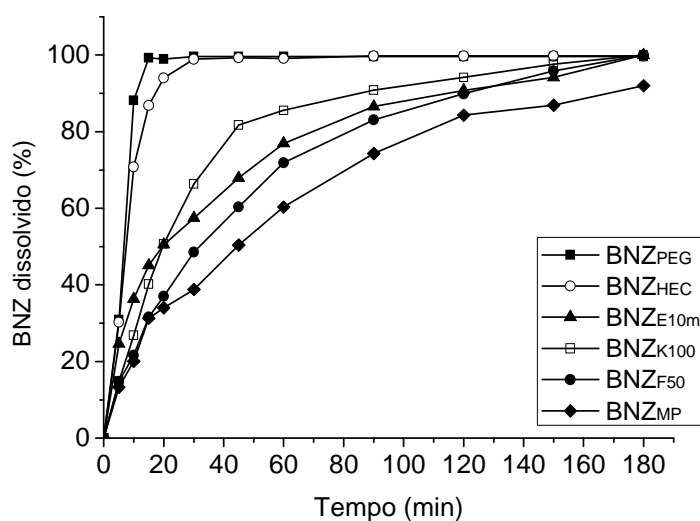
**Figura 4. 3: Perfil de dissolução do BNZ matéria-prima em condições *Sink* a 37°C.**

A fim de melhorar a dissolução do BNZ e conseqüentemente, sua biodisponibilidade utilizou-se uma técnica de micronização baseada na recristalização espontânea do fármaco na

presença de polímeros hidrofílicos estabilizantes, ocasionada por uma mudança na polaridade da solução de fármaco. Esta técnica permite obter partículas com tamanhos bastante reduzidos e de elevada área superficial, conduzindo a um aumento significativo da velocidade de dissolução de fármacos (RASENACK; MÜLLER, 2002; VARSHOSAZ et al., 2008).

O doseamento do BNZ nos microcristais obtidos durante a fase de otimização da técnica revelou valores próximos a 100%, o que indica que a quantidade de polímero remanescente nos microcristais é praticamente desprezível. Estes resultados são condizentes com outros estudos da literatura que aplicaram técnicas similares e pode ser explicado pela reduzida concentração do polímero estabilizante utilizado e pela quantidade reduzida de estabilizante que é necessária para revestir os microcristais de fármaco (CUNHA-FILHO et al., 2008).

Durante a fase de otimização da técnica, foram testados vários polímeros os quais, em sua maioria, trouxeram melhorias importantes na velocidade de dissolução do fármaco, conforme mostrado na figura 4.4.



**Figura 4. 4: Perfis de dissolução dos microcristais de BNZ preparados com diferentes polímeros.** Sendo BNZ<sub>PEG</sub>, BNZ<sub>HEC</sub>, BNZ<sub>E10m</sub>, BNZ<sub>K100</sub>, BNZ<sub>F50</sub>, os microcristais preparados a partir dos polímeros: polietilenoglicol 4000, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose E10m, hidroxipropilmetilcelulose K100, hidroxipropilmetilcelulose F50, respectivamente e BNZ<sub>MP</sub> corresponde ao benznidazol matéria-prima original.

Observa-se que todas as preparações obtidas pela técnica de recristalização por mudança de solvente chegaram a mais de 90% de dissolução em 180 minutos (Figura 4.4).

Os microcristais preparados com o polímero HPMC<sub>F50</sub> não apresentaram mudanças significativas na velocidade de dissolução do BNZ, mostrando apenas um pequeno aumento no valor da ED<sub>20</sub> (21,4 ± 3,1) (Tabela 4.2). As outras duas variedades de HPMC (K100 e E10m) conseguiram melhoras significativas na velocidade de dissolução do fármaco, apresentando valores de ED<sub>20</sub> de 26,8 ± 1,3 e 32,8 ± 2,5, respectivamente (Tabela 4.2).

**Tabela 4. 2: Valores de ED<sub>20</sub> para microcristais obtidos através do uso de diferentes polímeros.**

Amostra	ED <sub>20</sub> (DP) <sup>a</sup>
BNZ	20,7 (2,3)
BNZ <sub>F50</sub>	21,4 (3,1)
BNZ <sub>K100</sub>	26,8 (1,3)
BNZ <sub>E10m</sub>	32,8 (2,5)
BNZ <sub>PEG</sub>	66,6 (0,3)
BNZ <sub>HEC</sub>	60,9 (0,9)

<sup>a</sup>Dados representados como a média e o desvio padrão (em parênteses) dos resultados, n= 3.

Resultados ainda melhores de incremento de dissolução foram obtidos para os microcristais BNZ<sub>PEG</sub> e BNZ<sub>HEC</sub>. As cápsulas contendo os microcristais BNZ<sub>PEG</sub> propiciaram uma dissolução quase instantânea do fármaco, com 100% de dissolução em apenas 10 minutos e ED<sub>20</sub> de 66,6 (±0,3). Resultados similares foram encontrados para BNZ<sub>HEC</sub>, com uma ED<sub>20</sub> de 60,9 (±0,9).

Segundo a avaliação estatística realizada, foi possível agrupar as formulações, segundo a ordem crescente de eficiência de dissolução com 95% de confiança, da seguinte forma:

$$\mathbf{BNZ_{MP} = BNZ_{F50} < BNZ_{K100} < BNZ_{E10m} < BNZ_{HEC} < BNZ_{PEG}.}$$

Diante dos resultados obtidos, optou-se por selecionar os polímeros PEG e HEC para dar seguimento às outras etapas do estudo.

Os demais parâmetros da técnica otimizados encontram-se descritos na tabela 4.3.

Tabela 4. 3: Dados de rendimento e ED<sub>20</sub> dos microcristais de BNZ preparados com PEG e HEC.

Condições		Microcristais de BNZ							
		BNZ <sub>PEG</sub>				BNZ <sub>HEC</sub>			
		Rendimento	DP	ED20	DP	Rendimento	DP	ED20	DP
Solvente	Acetona	91,48%	0,4	-	-	90,05%	0,2	-	-
	Metanol	68,57%	9,1	-	-	75,61%	2,1	-	-
	Etanol	0,33%	0,5	-	-	1,78%	0,4	-	-
Temperatura	5°C	89,57%	2,3	-	-	85,18%	2,8	-	-
	25°C	91,48%	0,4	-	-	90,05%	0,2	-	-
Proporção FO/FA	1:0,5	73,95%	7,9	-	-	75,31%	6,2	-	-
	1:1	89,77%	2,6	-	-	88,25%	2,7	-	-
	1:4	91,48%	0,4	-	-	90,05%	0,2	-	-
	1:8	85,12%	2,6	-	-	77,25%	5,4	-	-
Concentração de Polímero	0,005%	84,17%	3,4	51,16	4,7	87,01%	2,3	61,95	3,9
	0,01%	87,43%	1,6	62,28	0,7	88,31%	2,1	61,18	0,9
	0,05%	83,29%	0,7	61,0	3,4	81,71%	0,7	60,99	5,8
	0,1%	91,48%	0,4	66,56	0,3	90,05%	0,2	60,92	0,9

Dentre os solventes analisados, o etanol apresentou o menor rendimento de microcristais, com apenas 1,78% para o BNZ<sub>HEC</sub> e 0,33% para o BNZ<sub>PEG</sub>, o que inviabilizaria seu uso devido ao grande desperdício de fármaco que permanece sem recristalizar. O metanol apresentou um rendimento de 75,61% de fármaco recuperado para o BNZ<sub>HEC</sub> e 68,57% para o BNZ<sub>PEG</sub>. A acetona apresentou os maiores rendimentos absolutos, 90,05% para o BNZ<sub>HEC</sub> e 91,48% para o BNZ<sub>PEG</sub>. Estes resultados fizeram da acetona o solvente de escolha para composição da fase orgânica, não apenas devido aos rendimentos de microcristais, mas também devido à maior solubilidade do BNZ nesse solvente e sua menor toxicidade, quando comparado com o metanol.

Quanto à temperatura, foram encontrados resultados similares de rendimento para ambos os tipos de microcristais produzidos, a 5°C e a 25°C (Tabela 4.3), não havendo diferença significativa entre os resultados. Selecionou-se, portanto, a temperatura de 25°C, já que nesta condição a rotina de laboratório e produção é facilitada.

Em relação à proporção de mistura de fases FA:FO (Tabela 4.3), segundo a avaliação estatística por ANOVA simples, as proporções testadas para o BNZ<sub>PEG</sub> podem ser agrupadas da seguinte forma: **1:4 = 1:1 = 1:8 ≠ 1:0,5**

Conclusões similares são encontradas para o BNZ<sub>HEC</sub>: **1:4 = 1:1 ≠ 1:8 = 1:0,5**

Para ambos os polímeros, a análise estatística apontou as proporções 1:1 e 1:4 como melhores. A relação 1:0,5 mostrou-se pouco eficiente em inverter a polaridade do sistema,

apresentando um rendimento de precipitação sensivelmente mais baixo. Enquanto que a proporção 1:8 aumentou muito a fração aquosa na mistura que possivelmente passou a solubilizar os microcristais de BNZ, propiciando valores absolutos de rendimento inferiores.

Desta forma, a relação 1:1 foi selecionada inicialmente, por ser mais vantajosa, uma vez que utiliza menor quantidade de polímero e representa um menor volume a ser filtrado. Contudo, durante a mudança de escala de produção foi necessário um ajuste desse parâmetro devido a problemas de rendimento.

Com relação à concentração do polímero (Tabela 4.3) avaliou-se além do rendimento, também o perfil de dissolução. Considerando a eficiência de dissolução, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre as concentrações, com exceção feita a concentração de 0,005% elaborada com PEG que apresentou um perfil de dissolução estatisticamente mais lento. Este comportamento pode ser explicado devido à falta de estabilizante em quantidade apropriada. Em relação ao rendimento, para ambos os polímeros, a concentração de 0,1% mostrou o maior valor de rendimento sendo, portanto, a concentração de escolha.

#### *4.3.1.2. Transposição da escala produtiva*

Durante a ampliação de escala de produção dos microcristais, foi necessário fazer um ajuste na proporção FO:FA utilizada. A proporção 1:1 inicialmente definida na etapa de otimização do método em escala de bancada, não foi suficiente para promover a inversão de polaridade no sistema de maior escala e quase nenhuma cristalização foi obtida. Foi necessário modificar a proporção de mistura de fases para 1:4 (FO:FA), de forma a obter rendimentos similares ao da escala de bancada. As demais condições da técnica se mantiveram inalteradas.

Procedeu-se uma caracterização mais completa dos microcristais obtidos em maior escala, avaliando-se não apenas suas características físico-químicas, mas também seu comportamento reológico, de interesse para a produção industrial de comprimidos.

No doseamento dos microcristais BNZ<sub>PEG</sub> verificou-se um resultado semelhante ao obtido em escala de bancada, com uma quantidade polímero não mensurável através do método empregado (Tabela 4.4). Neste caso, para efeito de cálculos, considerou-se que 100% dos microcristais eram constituídos de BNZ. No entanto, para os microcristais de BNZ estabilizados pelo HEC, diferentemente do que ocorreu na escala de bancada, observou-se um

teor de BNZ na ordem de 94%, correspondendo, portanto 6% ao polímero. Este resultado foi considerado para correção do teor de BNZ nos ensaios de dissolução (Tabela 4.4).

**Tabela 4. 4: Doseamento dos microcristais de BNZ obtidos pela transposição de escala.**

Microcristais	Média (%)	DP <sup>a</sup>
BNZ <sub>HEC</sub>	93,56	1,07
BNZ <sub>PEG</sub>	101,3	0,95

<sup>a</sup>Dados representados como a média e desvio padrão (DP) dos resultados, n= 3.

O ensaio de dissolução realizado revelou que os perfis de dissolução dos microcristais obtidos em maior escala se mantiveram rápidos (Tabela 4.5). As eficiências de dissolução foram estatisticamente semelhantes às obtidas em menor escala, o que demonstrou que o tamanho da escala de produção não prejudicou os perfis de dissolução dos microcristais.

**Tabela 4. 5: Eficiências de dissolução dos microcristais de BNZ.**

Tamanho do lote	Amostra	ED <sub>20</sub> (DP)
50g	BNZ <sub>PEG</sub>	70,9 (3,5)
	BNZ <sub>HEC</sub>	63,5 (1,7)
200mg	BNZ <sub>PEG</sub>	66,6 (0,3)
	BNZ <sub>HEC</sub>	60,9 (0,9)

A determinação do comportamento mecânico dos sólidos é um fator importante no desenvolvimento farmacotécnico, pois as características de fluxo interferem diretamente nos processos utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas (GELDART et al., 2006).

O comportamento reológico dos microcristais foi comparado com os índices obtidos para o BNZ matéria-prima e encontram-se descritos na tabela 4.6.

**Tabela 4. 6: Propriedades de fluxo dos microcristais de BNZ.**

Material	Tempo de escoamento (s)	Ângulo de Repouso (°)	Índice de Compressibilidade IC	Densidade de enchimento (g/mL)
BNZ <sub>MP</sub>	Infinito	60	40,67	0,39
BNZ <sub>HEC</sub>	Infinito	58,33	60,56	0,15
BNZ <sub>PEG</sub>	Infinito	60	56	0,20

Observou-se que no ensaio de tempo de escoamento, nenhuma das amostras fluiu livremente, confirmando o caráter extremamente coesivo desses materiais. O ângulo de repouso foi determinado pelo escoamento forçado através do funil e os valores encontrados são bastante elevados, tanto para a matéria-prima quanto para os microcristais.

O índice de compressibilidade confirmou a deficiente mobilidade do BNZ matéria-prima, e a sua piora após o tratamento através da técnica de micronização. A redução dos tamanhos de partícula nas amostras de microcristais de BNZ, conforme se comprovou por microscopia, parece elevar a coesão entre as partículas e explica essa piora encontrada nos ensaios de reologia.

Os resultados de densidade de enchimento também revelaram uma piora neste parâmetro para os microcristais, que se apresentam extremamente leves. Essas características dificultam seu processamento tecnológico industrial e inviabilizam a obtenção de comprimidos por compressão direta.

No ensaio de superfície específica, observou-se um aumento na área superficial dos microcristais BNZ<sub>HEC</sub>, em comparação com o valor obtido para o BNZ matéria-prima (Tabela 4.7).

**Tabela 4. 7: Valores de densidade, superfície específica e porosidade dos microcristais de BNZ.**

Propriedade	BNZ <sub>MP</sub>	BNZ <sub>PEG</sub>	BNZ <sub>HEC</sub>
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,35	1,29	1,29
Superfície Específica (m <sup>2</sup> /g)	0,50	0,52	1,10
Volume de Microporos (cm <sup>3</sup> /kg)	0,0003	0,0002	0,0005
Área de Microporos (m <sup>2</sup> /g)	0,82	0,68	1,51
Tamanho médio dos Microporos (nm)	8,23	6,337	5,907
Volume Total de Poros (cm <sup>3</sup> /kg)	0,00141	0,00099	0,002165
Diâmetro Máximo dos Poros (Å)	1376,1	5469,2	2443,1
Diâmetro Médio dos Poros (Å)	112,8	77,21	78,65

Baseando-se na equação de Noyes-Whitney é possível relacionar os resultados de velocidade de dissolução conseguidos, com esse incremento na área superficial das partículas. Observou-se ainda que o aumento da porosidade dessas amostras (Tabela 4.7) melhora a capacidade de interação com o meio de dissolução e conseqüentemente acelera a solubilização do BNZ.

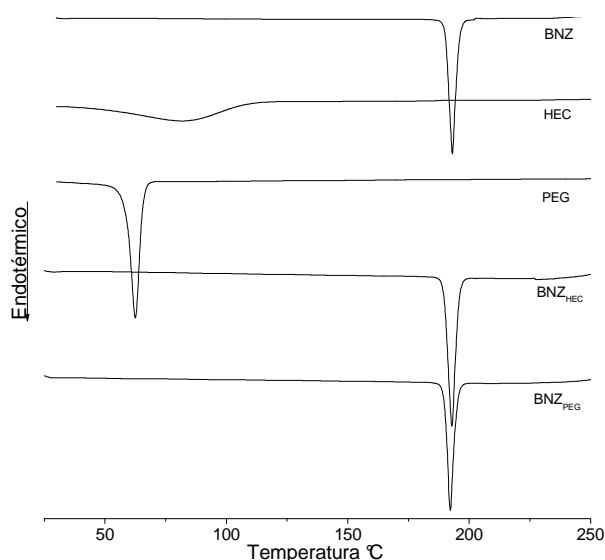
Em contraste, nos microcristais de BNZ obtidos em presença de PEG não foi observado um aumento na área superficial do BNZ (Tabela 4.7). Neste caso, a elevada



eficiência de dissolução conseguida por esses microcristais poderia ser explicada pela melhor umectação dos mesmos, favorecidas pelo delgado revestimento polimérico de PEG, bastante hidrofílico.

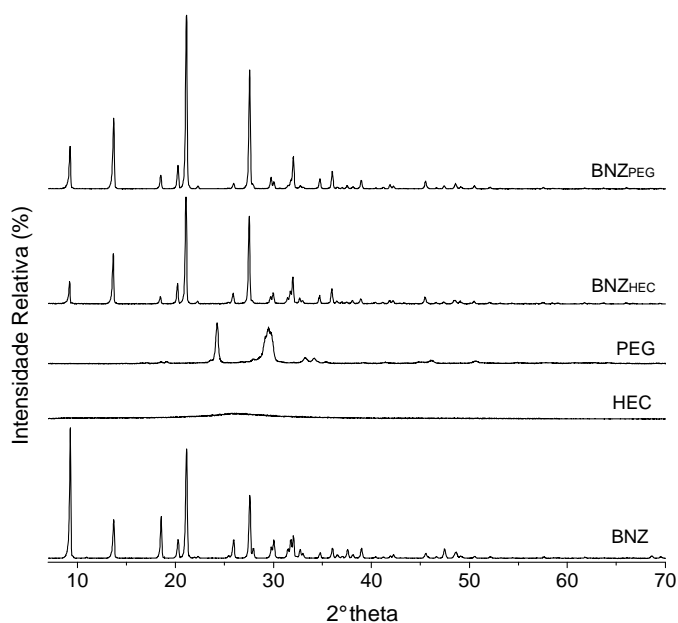
A pequena modificação observada na densidade dos microcristais de BNZ em comparação com o BNZ matéria-prima (Tabela 4.7) pode ter sido ocasionada pela presença do polímero e/ou pelo aumento da porosidade das amostras.

O perfil térmico do BNZ matéria-prima e dos microcristais  $\text{BNZ}_{\text{HEC}}$  e  $\text{BNZ}_{\text{PEG}}$ , assim como dos polímeros PEG e HEC encontram-se representados na figura 4.5. Observou-se que nas amostras de microcristais do fármaco, nenhum evento térmico inesperado foi encontrado. Não se nota nessas amostras qualquer evento térmico referente aos polímeros, confirmando a reduzida quantidade destes componentes nas amostras sólidas.



**Figura 4. 5:** Curvas de DSC dos microcristais de BNZ [ $\text{BNZ}_{\text{PEG}}$  e  $\text{BNZ}_{\text{HEC}}$ ], do BNZ matéria-prima, do HEC e do PEG isolados.

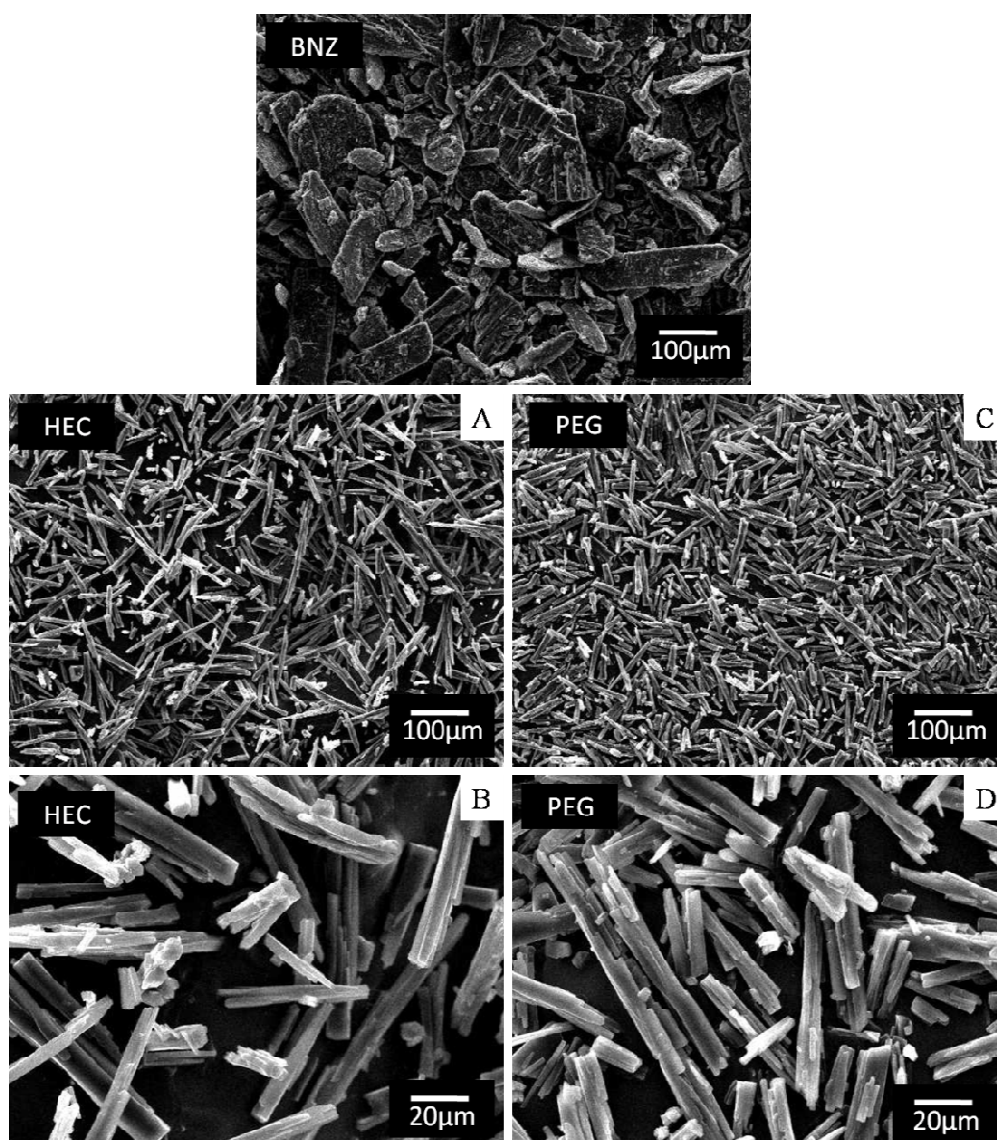
A análise por difração de raios-X das amostras de microcristais (Figura 4.6) revelaram um perfil típico de composto cristalino, mostrando que nenhuma alteração da cristalinidade do BNZ ocorreu durante o processo de obtenção dos microcristais.



**Figura 4. 6: Difratomogramas de raios-X do pó de amostras de BNZ, HEC, PEG e dos microcristais BNZ<sub>HEC</sub> e BNZ<sub>PEG</sub>.**

O perfil difratométrico de BNZ<sub>PEG</sub> e BNZ<sub>HEC</sub> foi semelhante ao perfil do BNZ matéria-prima, mostrando pequenas diferenças nas intensidades relativas dos picos, justificadas pela orientação preferencial dos pequenos cristais obtidos com a preparação dos microcristais. Também nesse ensaio, não se observou sinais da presença dos polímeros nos difratogramas dos microcristais.

A análise morfológica dos microcristais BNZ<sub>PEG</sub> e BNZ<sub>HEC</sub> (Figura 4.7) revelou formas aciculares bem delineadas com tamanhos relativamente homogêneos. Comparando-se com o BNZ matéria-prima, observou-se uma morfologia similar, porém com nítida redução do tamanho de partícula do fármaco nas amostras obtidas pela técnica de recristalização por mudança de solvente quando comparadas com o BNZ original.



**Figura 4. 7: Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos microcristais de BNZ.** BNZ = Partículas originais de benzimidazol; (A) e (B) microcristais de BNZ<sub>HEC</sub> nos aumentos de 130X e 650X, respectivamente; e (C) e (D) são fotomicrografias de BNZ<sub>PEG</sub>, nos aumentos de 130X e 650X, respectivamente.

Os dados de solubilidade dos microcristais de BNZ em água destilada, não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o dado de solubilidade do BNZ matéria-prima (Tabela 4.8). Este resultado corrobora a hipótese de que o polímero estabilizante está presente em uma mínima fração, apenas revestindo os microcristais, e que sua presença não afeta a capacidade de solubilização do meio, excluindo esse parâmetro sobre o efeito na cinética de dissolução do fármaco.

**Tabela 4. 8: Solubilidade dos microcristais de BNZ em água destilada a 25°C.**

Amostra	Solubilidade (mg/mL)
BNZ	0,237 (0,012)
BNZ <sub>HEC</sub>	0,249 (0,003)
BNZ <sub>PEG</sub>	0,245 (0,007)

<sup>a</sup>Dados representados como a média e desvio padrão dos resultados (entre parênteses), n= 3.

#### 4.3.2. Obtenção dos comprimidos convencionais a base de microcristais de benznidazol

Para a elaboração de comprimidos a base dos microcristais de BNZ, optou-se por utilizar a dose do medicamento disponível comercialmente, 100mg, que embora não satisfaça as condições *Sink* para o ensaio de dissolução (possui menor poder discriminatório), permite uma comparação direta com os comprimidos de BNZ fabricados pelos laboratórios Roche (Rochagan<sup>®</sup>).

Nesta fase, optou-se por avaliar o impacto que a utilização de um surfactante na formulação poderia causar. Neste sentido, utilizou-se o lauril sulfato de sódio [LSS] em parte das formulações (Tabela 4.1).

As deficientes propriedades de fluxo dos microcristais de BNZ tornariam o processo de compressão direta, atualmente a primeira escolha para a indústria farmacêutica, bastante difícil. Na tentativa de superar ou de ao menos reduzir as deficiências reológicas dos microcristais de BNZ foi selecionado um excipiente para compressão direta - Starch 1500<sup>®</sup>, composto de amido parcialmente pré-gelatinizado e que apresenta boas características de fluxo, elevada compressibilidade, além de ter função de desintegrante, diluente e molhante (ROWE et al., 2009; COLORCON, 1999). Entretanto, após incorporá-lo em diferentes proporções até o limite de 1:2 (fármaco:excipiente), apenas uma reduzida melhora na reologia da mistura física foi observada, como mostrado na tabela 4.9.

**Tabela 4. 9: Reologia da mistura dos microcristais e excipientes, na proporção de 1:2.**

Mistura	Tempo de escoamento (s)	Ângulo de repouso (°)	IC (%) <sup>a</sup>	Densidade de enchimento
F1BNZ <sub>HEC</sub>	infinito	51,0	39,3	0,38g/mL
F2BNZ <sub>HEC</sub>	infinito	49,3	40,5	0,38g/mL
F1BNZ <sub>PEG</sub>	infinito	56,3	46,0	0,37g/mL
F2BNZ <sub>PEG</sub>	infinito	54,7	42,7	0,37g/mL

<sup>a</sup>IC é o índice de compressibilidade. Dados representados como a dos resultados, n= 3.

A densidade aparente, embora maior, mostrou-se insuficiente para a realização do processo de compressão direta. Optou-se então por elaborar granulados por via seca, processo livre de solvente, que poderia alterar a natureza dos microcristais, e também capaz de elevar a densidade de enchimento do material, tornando viável a obtenção de comprimidos.

O granulado obtido, como já era esperado, produziu uma melhora na fluidez do material. A densidade de enchimento também alcançou um aumento suficiente para submeter as formulações ao processo de compressão (Tabela 4.10).

**Tabela 4. 10: Reologia dos granulados obtidos por via seca.**

Granulados	Tempo de escoamento (s)	Ângulo de repouso (°)	IC (%) <sup>a</sup>	Densidade de enchimento
F1BNZ <sub>HEC</sub>	3,6	43,0	25,3	0,58g/ml
F2BNZ <sub>HEC</sub>	3,8	36,7	21,7	0,58g/mL
F1BNZ <sub>PEG</sub>	3,6	35,7	27,8	0,56g/mL
F2BNZ <sub>PEG</sub>	8,5	38,3	30,9	0,56g/mL

<sup>a</sup>IC é o índice de compressibilidade. Dados representados como a média dos resultados, n= 3.

Durante o processo de compressão, as formulações elaboradas com o BNZ<sub>PEG</sub>, apresentaram dificuldades no enchimento da matriz, que se mostrou pouco uniforme durante todo o processo de compactação. As formulações com BNZ<sub>HEC</sub>, em contra partida, apresentaram enchimento da matriz uniforme, não ocasionando problemas durante a fase de compactação.

O peso médio dos comprimidos produzidos foi estipulado em 300mg, sendo 100mg de princípio ativo. No caso das formulações contendo o polímero HEC, devido ao seu teor inferior a 100%, o peso médio foi corrigido e passou a 320mg.

#### 4.3.2.1. Controle de qualidade dos comprimidos convencionais a base de microcristais de benznidazol

As formulações de comprimidos desenvolvidas apresentaram características semelhantes atendendo as especificações: comprimidos circulares, inodoros e convexos de coloração levemente amarelada. A figura 4.8 mostra o aspecto dos comprimidos elaborados com a formulação F2BNZ<sub>HEC</sub>.



**Figura 4. 8:** Comprimidos obtidos a partir da formulação F2BNZ<sub>HEC</sub>.

Considerando os pesos médios registrados, todas as formulações foram aprovadas, com exceção da formulação F2BNZ<sub>PEG</sub> que apresentou valor fora da faixa de aceitação, devido às dificuldades de enchimento da matriz durante a compressão (Tabela 4.11).

**Tabela 4. 11:** Valores de pesos médios dos comprimidos.

Formulação	Peso teórico (mg)	Peso médio (mg)	DP <sup>a</sup>	Resultado
F1BNZ <sub>HEC</sub>	320	316,4	5,8	APROVADO
F2BNZ <sub>HEC</sub>	320	317,9	4,5	APROVADO
F1BNZ <sub>PEG</sub>	300	301,7	4,0	APROVADO
F2BNZ <sub>PEG</sub>	300	306,0	15,9	REPROVADO

<sup>a</sup>Dados representados como a média e o desvio padrão (DP) dos resultados, n= 3.

No ensaio de doseamento, considerando-se o intervalo de aceitação entre 95 e 105%, todas as formulações foram aprovadas, ainda que a formulação F2PEG tenha apresentado um desvio padrão muito elevado, clara evidência da falta de uniformidade de conteúdo desse lote de comprimidos (Tabela 4.12).

**Tabela 4. 12:** Doseamento dos comprimidos obtidos a partir dos microcristais de BNZ.

Formulação	Média (%)	DP	Resultado
F1BNZ <sub>PEG</sub>	97,67	1,41	APROVADO
F1BNZ <sub>HEC</sub>	100,01	3,69	APROVADO
F2BNZ <sub>PEG</sub>	104,70	16,97	APROVADO
F2BNZ <sub>HEC</sub>	101,21	3,07	APROVADO

Dados representados como a média e desvio padrão (DP) dos resultados, n= 3.

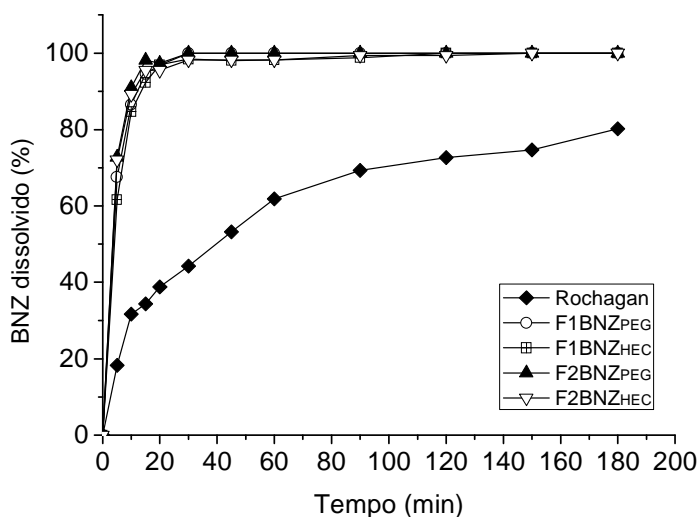
Nos ensaios de dureza e friabilidade (Tabelas 4.13) todas as formulações foram aprovadas estando dentro dos parâmetros especificados para cada ensaio.

**Tabela 4. 13: Dados do ensaio de dureza e friabilidade (n=10).**

Formulação	Dureza (kgf)	Friabilidade (%)	Resultado
F2BNZ <sub>HEC</sub>	3,25	1,0587	APROVADO
F2BNZ <sub>PEG</sub>	3,10	0,9678	APROVADO
F1BNZ <sub>HEC</sub>	9,50	0,0919	APROVADO
F1BNZ <sub>PEG</sub>	5,05	0,2014	APROVADO

Com a relação à desintegração, todas as formulações foram aprovadas apresentando completa desintegração em metade do tempo estipulado como limite no ensaio.

O teste de dissolução mostrou que todas as formulações, elaboradas a base de microcristais de BNZ, alcançaram 85% de dissolução em apenas 10 minutos, satisfazendo os critérios farmacopéicos e limites de aceitação estabelecidos pela FDA para formas farmacêuticas de liberação imediata (Figura 4.9). O ensaio comprovou ainda que os processos de granulação e compactação não afetaram a natureza dos microcristais de BNZ, que conservaram sua rapidez de dissolução.



**Figura 4. 9: Perfis de dissolução dos comprimidos (F1 e F2) e do Rochagan®.** Formulações obtidas a partir dos microcristais de BNZ. Rochagan® é o medicamento disponível comercialmente.

Não obstante, os comprimidos de Rochagan®, produzido pelo laboratório Roche e utilizados até então como única forma farmacêutica a base de BNZ, mostraram desempenho

inferior, com pouco mais de 60% fármaco dissolvido em 1h. Este resultado revela que os lotes de Rochagan<sup>®</sup>, utilizados para este estudo não cumprem os requisitos preconizados pela FDA.

A comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos a base dos microcristais e o Rochagan<sup>®</sup>, corrobora a acentuada melhora de solubilização destas formulações, com incrementos nos valores de ED<sub>20</sub> superiores a 2 vezes (Tabela 4.14).

**Tabela 4. 14: Valores de ED<sub>20</sub> para diferentes formulações elaboradas e do Rochagan<sup>®</sup>.**

<b>Formulação</b>	<b>ED<sub>20</sub> (DP)<sup>a</sup></b>
<b>F2BNZ<sub>HEC</sub></b>	75,25(0,59)
<b>F2BNZ<sub>PEG</sub></b>	75,27(1,23)
<b>F1BNZ<sub>HEC</sub></b>	71,67(0,59)
<b>F1BNZ<sub>PEG</sub></b>	74,23(0,44)
<b>Rochagan<sup>®</sup></b>	31,07(5,09)

<sup>a</sup>Dados representados como a média e o desvio padrão (entre parênteses) dos resultados, n=3

Observando-se os perfis de dissolução e as ED<sub>20</sub>, nota-se um resultado similar entre as quatro formulações de comprimidos a base de microcristais de BNZ desenvolvidos. Nos comprimidos contendo BNZ<sub>HEC</sub>, a presença do tensoativo LSS promoveu uma ligeira melhora na eficiência de dissolução dos comprimidos, enquanto que nas formulações com PEG não houve diferença estatística significativa entre as eficiências de dissolução descartando, neste caso, uma possível contribuição do LSS para a melhoria do perfil de dissolução.

Com base no comportamento reológico dos granulados, na facilidade de processamento durante a compressão e nos resultados do controle de qualidade dos comprimidos, a formulação F2BNZ<sub>HEC</sub> apresentou os melhores resultados nos testes farmacopeicos. E, apesar do polímero PEG mostrar-se capaz de produzir microcristais de BNZ com alta velocidade de dissolução, o comportamento das formulações a base destes microcristais (F1BNZ<sub>PEG</sub> e F2BNZ<sub>PEG</sub>) foi desfavorável em relação aos testes e ao processo de compressão realizados. Somado a isso, os dados obtidos no estudo de compatibilidade fármaco-excipiente contribuíram para descartar o PEG dos próximos estudos.

Assim, escolheu-se a formulação F2BNZ<sub>HEC</sub> para ser testada em modelo animal para doença de Chagas na próxima etapa do estudo



#### 4.4. CONCLUSÃO

O método de micronização de fármacos através da recristalização por mudança de solvente mostrou-se capaz de produzir cristais de BNZ de tamanho reduzido, estáveis física e quimicamente e capazes de solubilizar-se rapidamente. Esse método apresenta como vantagem em relação a outros métodos de micronização, a cristalização controlada das partículas, evitando aglomerações, instabilidades e acúmulo de cargas eletrostáticas, comuns em métodos de pulverização mecânica.

Observou-se um acentuado incremento no perfil de dissolução dos microcristais de BNZ, explicados não apenas pelo efeito do aumento da superfície específica das amostras, mas também devido à decisiva influencia dos polímeros hidrofílicos que atuam estabilizando os cristais de BNZ em tamanhos reduzidos que propiciam sua solubilização.

O método desenvolvido e otimizado em escala de bancada permitiu a preparação em escala maior apresentando boas perspectivas para produção industrial devido à simplicidade da técnica e aos resultados consistentes obtidos.

A formulação de comprimidos selecionada para a realização de ensaio em animais elaborada a partir de microcristais BNZ<sub>HEC</sub> apresentou-se dentro das especificações farmacopéicas, mostrando um perfil de dissolução mais rápido que os comprimidos comercializados a base de BNZ. Esses resultados indicam perspectivas animadoras de melhora terapêutica para o BNZ no tratamento da doença de Chagas.

## Capítulo 5: Desenvolvimento de comprimidos efervescentes de benznidazol utilizando complexos de inclusão com ciclodextrinas

### 5.1. INTRODUÇÃO

A utilização terapêutica do benznidazol, além dos problemas já relatados de biodisponibilidade devido sua deficiente solubilidade aquosa, tem como agravantes a longa duração do tratamento (30-60 dias), a toxicidade dose-dependente, a elevada taxa de não adesão dos pacientes e a indisponibilidade de doses pediátricas. Organizações como o *Drugs for Neglected Disease Initiative* [DNDi] tem incentivado pesquisas na América Latina para o desenvolvimento de novas formulações mais viáveis para o tratamento da doença de Chagas (DNDi América Latina, 2010).

Neste contexto, a utilização de ciclodextrinas aparece como uma alternativa promissora. Estes excipientes são oligossacarídeos cíclicos que apresentam uma cavidade interna lipofílica e a superfície externa hidrofílica, capazes de interagir com grande quantidade de fármacos, formando complexos de inclusão não covalentes que melhoram a solubilidade e a velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis em água (LOFTSSON; BREWNSTER, 2010).

A presença desses açúcares confere grande massa física às formulações devido às elevadas quantidades de ciclodextrinas necessárias para formar os complexos de inclusão em estado sólido, sendo este um fator limitante ao uso das ciclodextrinas em formas sólidas para administração oral (CUNHA-FILHO et al., 2007). Contudo, a incorporação de benznidazol em sistemas sólidos com ciclodextrinas, utilizando matrizes de comprimidos efervescentes poderia evitar essa limitação.

Comprimidos efervescentes permitem incorporar mais de 2000mg de ingredientes em uma única dose, são preparações mais estáveis que as formas farmacêuticas líquidas e apresentam uma série de vantagens para a administração do benznidazol a pacientes com dificuldades de deglutição, como crianças e idosos (AULTON, 2005).

O efeito da reação efervescente sobre o complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina é um interessante ponto de vista ainda não explorado pela literatura. Além disso, até a presente data, apenas poucos trabalhos se concentraram no desenvolvimento de novas formas de administrar o benznidazol (LAMAS et al, 2006; LEONARDI et al, 2009; MORILLA et al, 2004) e nenhuma literatura descreveu o uso de ciclodextrinas para isso.

O objetivo deste estudo foi desenvolver comprimidos efervescentes a partir de complexo de inclusão de benznidazol e ciclodextrina. Para isso, foi empregado um desenho fatorial completo do tipo 3<sup>2</sup>, tendo como fatores de estudo a interferência das concentrações de ciclodextrina e da mistura efervescente na dissolução do fármaco e na sua estabilidade física frente à umidade ambiental.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1. Materiais

Neste estudo trabalhou-se com o fármaco benznidazol [BNZ] lote 13871 fornecido pela Roche. Os excipientes farmacêuticos utilizados foram: ácido tartárico, ácido cítrico anidro, bicarbonato de sódio, todos fornecidos pela Natural Pharma<sup>®</sup>; carbonato de sódio, ciclamato de sódio, manitol adquiridos pela Famos<sup>®</sup>. Foram utilizadas ainda, as ciclodextrinas naturais  $\alpha$ -ciclodextrina [ $\alpha$ CD] e  $\gamma$ -ciclodextrina [ $\gamma$ CD] produzidas pela Wacker Química<sup>®</sup> e a  $\beta$ -ciclodextrina [ $\beta$ CD] obtida da Cyclodex<sup>®</sup>, assim como as ciclodextrinas modificadas hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina [HP $\beta$ CD] e metil- $\beta$ -ciclodextrina randomizada [RM $\beta$ CD] (Cyclodex<sup>®</sup>).

### 5.2.2. Seleção da variedade de ciclodextrina utilizada no estudo

Estudos de solubilidade do BNZ, empregando diferentes tipos de ciclodextrinas em suas concentrações próximas à saturação, foram conduzidos de modo a selecionar a variedade de ciclodextrina a ser utilizada para elaboração de complexos de inclusão com o BNZ em estado sólido.

Os estudos foram realizados utilizando excesso de fármaco em 15mL de meio aquoso contendo as concentrações de ciclodextrinas a seguir:  $\alpha$ CD a 12% m/v;  $\beta$ CD a 1,8% m/v;  $\gamma$ CD a 22% m/v; HP $\beta$ CD a 45% m/v e RM $\beta$ CD a 25% m/v. As amostras foram inicialmente submetidas à banho de ultrassom por 15 minutos e colocados sob agitação magnética vigorosa a 25±2°C até o estabelecimento do equilíbrio de saturação (7 dias).

Em seguida, as amostras foram filtradas (0,45 $\mu$ m) e doseadas por metodologia espectrofotométrica previamente validada a 324nm. Esse experimento foi realizado em triplicata.

### 5.2.3. Obtenção dos complexos de inclusão

Os complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina [CI] foram obtidos a partir de uma mistura física [MF] entre o BNZ e a HP $\beta$ CD pelo método de malaxagem. As MF foram umectadas com solução de etanol/água (1:1 v/v) em um gral até a obtenção de uma pasta que foi extruída em granulador oscilante (FABBE<sup>®</sup>) utilizando um tamis de abertura de malha de 2,0mm. As amostras granuladas foram secas em estufa com circulação de ar (FABBE<sup>®</sup>) por 2h a 40°C. A proporção de fármaco e ciclodextrina utilizada para cada formulação seguiu o planejamento experimental descrito a seguir (Tabela 5.1).

### 5.2.4. Preparação dos granulados efervescentes

Os granulados efervescentes foram preparados a partir de uma mistura de ácidos orgânicos e de sais de reação básica através de granulação por via úmida utilizando como líquido de umectação, etanol a 96°GL. O material umedecido foi extruído em granulador oscilante (FABBE<sup>®</sup>) utilizando um tamis de abertura de malha de 2,0mm. Os grânulos foram secos em estufa com circulação de ar (FABBE<sup>®</sup>) por 2h a 40°C.

Diferentes combinações de ácidos e sais básicos foram testadas de forma a selecionar a composição mais favorável considerando o tempo de desintegração. A mistura efervescente [ME] definida para o estudo foi composta de ácido cítrico, ácido tartárico, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio na proporção otimizada de 25% (m/m) para cada componente.

### 5.2.5. Planejamento experimental - Desenho fatorial

A composição das formulações de comprimidos de BNZ foi elaborada de acordo com um desenho fatorial completo do tipo 3<sup>2</sup>, onde foram definidos como variáveis independentes: a concentração de ciclodextrina no complexo de inclusão e a concentração da mistura efervescente adicionada à formulação, ambas avaliadas em três níveis (alta, média e baixa) (GOHEL; PATEL, 2003; KETTANEH-WOLD, 1991). As concentrações de ciclodextrina utilizadas na produção dos comprimidos foram de 8%, equivalente a proporção equimassa com o fármaco e considerada como nível de concentração baixa; de 48%, equivalente a proporção equimolar com o fármaco e definida como nível de concentração

média; e 60%, considerada como nível de concentração alta. Para a ME, as proporções de 10, 20 e 30% foram assumidas como nível de concentração baixa, média e alta, respectivamente.

As variáveis dependentes analisadas foram a eficiência de dissolução em 15 minutos [ED<sub>15</sub>] e a absorção ou perda de água pelos comprimidos submetidos à condições de umidade relativa elevada e em condições de ausência de umidade. A composição das formulações preparadas encontra-se descrita na tabela 5.1.

Os resultados obtidos foram processados utilizando o software *Design-Expert version 8*<sup>®</sup>, que apontou o modelo polinomial mais apropriado, assim como estabeleceu a significância estatística de seus termos. A validação do modelo matemático foi realizada através de análise de variância (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ), do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) e do parâmetro estatístico falta de ajuste (FEKETE et al., 1998; SOARES et al., 2005).

**Tabela 5. 1: Composição das formulações elaboradas a partir do planejamento fatorial.**

Formulação	BNZ		HP $\beta$ CD		ME		Ciclamato de sódio		Manitol	
	mg*	%	mg*	%	mg*	%	mg*	%	mg*	%
F1	100,0	8,0	750,0	60,0	375,0	30,0	12,5	1,0	12,5	1,0
F2	100,0	8,0	600,0	48,0	375,0	30,0	12,5	1,0	162,5	13,0
F3	100,0	8,0	100,0	8,0	375,0	30,0	12,5	1,0	662,5	53,0
F4	100,0	8,0	750,0	60,0	250,0	20,0	12,5	1,0	137,5	11,0
F5	100,0	8,0	600,0	48,0	250,0	20,0	12,5	1,0	287,5	23,0
F6	100,0	8,0	100,0	8,0	250,0	20,0	12,5	1,0	787,5	63,0
F7	100,0	8,0	750,0	60,0	125,0	10,0	12,5	1,0	262,5	21,0
F8	100,0	8,0	600,0	48,0	125,0	10,0	12,5	1,0	412,5	33,0
F9	100,0	8,0	100,0	8,0	125,0	10,0	12,5	1,0	912,5	73,0

\* Para um comprimido com peso teórico de 1250mg.

### 5.2.6. Desenvolvimento de comprimidos efervescentes

Lotes de 25g de cada formulação foram preparados em compressora excêntrica modelo Primel (FABBE<sup>®</sup>) utilizando punção de 16mm e formato circular plano. As formulações definidas pelo planejamento experimental foram obtidas a partir da mistura dos diferentes componentes por 15 minutos (Tabela 5.1) em misturador em V da marca FABBE<sup>®</sup>. O peso teórico dos comprimidos foi ajustado para 1250mg. Todas as formulações foram elaboradas com 100mg de BNZ (dose terapêutica utilizada).

### **5.2.7. Ensaios de caracterização físico-química dos complexos de inclusão e dos comprimidos efervescentes**

#### *5.2.7.1. Doseamento do Benznidazol*

A determinação do BNZ durante este estudo foi realizada utilizando-se metodologia espectrofotométrica previamente validada a 324nm, conforme descrito no capítulo 1 desta dissertação.

#### *5.2.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura*

A morfologia dos complexos de inclusão de fármaco-ciclodextrina foi estudada por microscopia eletrônica de varredura, conforme descrito no item 2.2.9.

#### *5.2.7.3. Difração de raios-X do pó*

Os perfis difratométricos dos complexos de inclusão podem ser fontes de informações importantes sobre a cristalinidade ou possíveis alterações da fase cristalina que podem ocorrer durante o processo de obtenção dos complexos. Os ensaios de difração foram conduzidos de acordo com o item 2.2.6.

#### *5.2.7.4. Perfil térmico dos complexos de inclusão*

O comportamento térmico dos complexos obtidos foi avaliado por DSC conforme condições estabelecidas no item 2.2.5.

#### *5.2.7.5. Peso médio dos comprimidos efervescentes*

A uniformidade de peso das nove formulações produzidas foi verificada pesando-se 20 comprimidos de cada formulação e seus pesos médios foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O critério de aceitação adotado estabelece uma variação máxima de  $\pm 5\%$  sobre o peso teórico (F. BRAS. IV, 1988).

#### 5.2.7.6. Perfil de dissolução dos complexos de inclusão e dos comprimidos efervescentes

Os perfis de dissolução dos complexos de inclusão preparados foram conduzidos em um dissolutor Nova Etica® modelo 299 seguindo as seguintes condições: aparato de agitação cesto, 900mL de fluido gástrico simulado (USP 30, 2008), rotação de 75rpm e temperatura igual a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . As amostras de CI contendo o equivalente a 50mg de BNZ foram colocadas em cápsulas gelatinosas duras.

O ensaio de dissolução das nove formulações foi conduzido empregando-se as mesmas condições descritas acima, com exceção do aparato de agitação que nesse caso foi pá, aparato recomendado para comprimidos.

Os complexos e as formulações foram avaliados de acordo com suas  $ED_{15}$ , calculadas conforme descrito no item 4.2.2.4, para o intervalo de 0-15 minutos, sendo os valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 5.2.7.7. Tempo de desintegração

Seis comprimidos de cada lote foram colocados em 200mL de água a  $25^\circ\text{C}$ . Os comprimidos foram considerados desintegrados quando os todos os fragmentos estavam completamente dispersos e a liberação de gás finalizada (RFE, 2007).

#### 5.2.7.8. Teste de resistência a umidade ambiental

Como forma de avaliar a estabilidade física dos comprimidos efervescentes de BNZ elaborados frente a condições adversas de umidade relativa utilizou-se o modelo experimental de sorção de água proposto por Callahan e colaboradores (1982) (CALLAHAN et al. 1982).

Os comprimidos de BNZ (Tabela 5.1) foram expostos as condições de umidade relativa de 0% e de 80% durante 7 dias. Estas condições foram obtidas utilizando sílica dessecada e solução salina saturada de sulfato de amônio respectivamente, em sistemas fechados e mantidos a  $25^\circ\text{C}$  (GREENSPAN, 1977). A quantidade de água absorvida pelos comprimidos foi medida por gravimetria e o experimento foi executado em duplicata.

### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O benznidazol é um fármaco pertencente à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) cuja solubilidade aquosa deficiente (0,2mg/mL) compromete sua eficiência terapêutica (MAXIMIANO et al., 2010), por isso, a escolha da ciclodextrina a ser utilizada para produção dos complexos de inclusão em estado sólido baseou-se na habilidade em aumentar a solubilidade do BNZ como mostrado na tabela 5.2.

Todas as CD testadas foram capazes de aumentar a solubilidade aquosa do BNZ, apesar das diferenças acentuadas de solubilidade em água entre as variedades de ciclodextrinas. As CD naturais proporcionaram uma solubilidade de até 0,5mg/mL para o BNZ, enquanto que as ciclodextrinas modificadas, HP $\beta$ CD e RM $\beta$ CD, atingiram 4,5 e 4,2mg/mL, respectivamente (Tabela 5.2).

**Tabela 5. 2: Solubilidade do BNZ frente às diferentes ciclodextrinas testadas a 25 °C.**

Meio	Solubilidade <sup>a</sup>	Incremento de solubilidade (vezes)
Água	0,237 ± 0,012	-
$\alpha$ CD a 12 %	0,589 ± 0,017	2,5
$\beta$ CD a 1,8 %	0,402 ± 0,012	1,7
$\gamma$ CD a 22 %	0,467 ± 0,022	2,0
HP $\beta$ CD a 45 %	4,568 ± 0,160	19,3
RM $\beta$ CD a 25 %	4,223 ± 0,222	17,8

<sup>a</sup>Dados representados como a média o desvio padrão, n=3.

O melhor resultado de aumento da solubilidade do BNZ foi encontrado com a variedade HP $\beta$ CD (Tabela 5.2). Essa ciclodextrina apresenta a maior solubilidade aquosa (45%) e foi capaz de incrementar a solubilidade do BNZ em quase 20 vezes. A HP $\beta$ CD é umas das ciclodextrinas modificadas mais descritas na literatura, possuindo vários estudos que atestam sua segurança em diferentes vias de administração, além de seu custo de aquisição ser um dos mais baixos quando comparado com outras variedades modificadas (ALEEM et al., 2008; LOFTSSON; BREWSTER, 2010; SZEJTLLI, 2004). Os resultados de solubilidade do BNZ conseguidos com a HP $\beta$ CD, aliado as suas vantagens industriais, colocaram essa variedade como a mais indicada para as demais etapas do estudo.

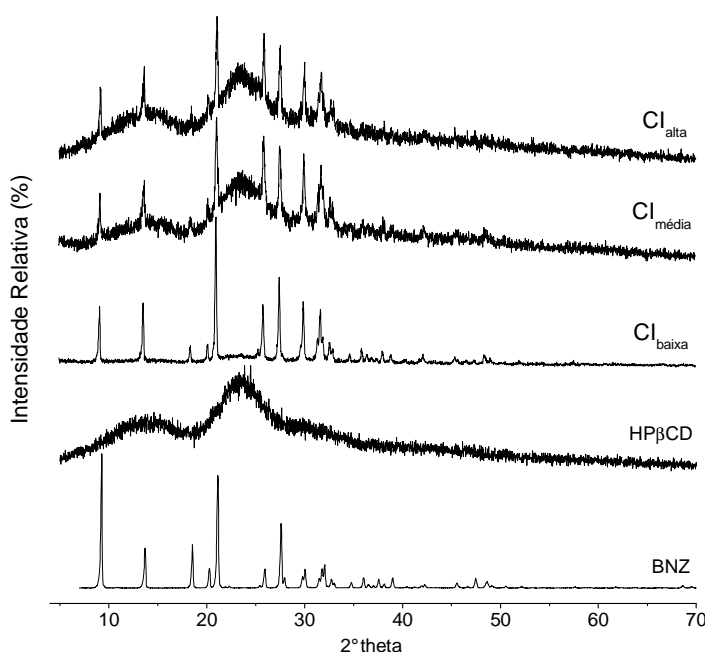
Seguindo o planejamento experimental proposto para este estudo, três complexos de inclusão BNZ-HP $\beta$ CD foram preparados utilizando diferentes proporções de fármaco e



ciclodextrina (Tabela 5.1). A caracterização físico-química foi realizada com o propósito de estabelecer o grau de interação entre os compostos e seu efeito na velocidade de dissolução do fármaco.

A figura 5.1 mostra os difratogramas de raios-X do pó das amostras de BNZ, HP $\beta$ CD e dos CI produzidos (alta, média e baixa). O BNZ apresentou um perfil típico policristalino, enquanto que a HP $\beta$ CD mostrou um perfil típico de produto amorfo. A presença da CD amorfa é percebida na linha de base das amostras de CI e está presente de forma mais pronunciada nas amostras CI<sub>média</sub> e CI<sub>alta</sub>, refletindo a grande proporção de HP $\beta$ CD nestes complexos.

Todos os picos principais do BNZ foram identificados nos CI em suas posições originais. Este fato sugere que nenhuma mudança na fase cristalina do fármaco foi observada. No entanto, algumas mudanças nas intensidades relativas dos picos foram observadas nas amostras malaxadas. Estas modificações, percebidas após o processo de malaxagem, indicam a possível interação entre os componentes.

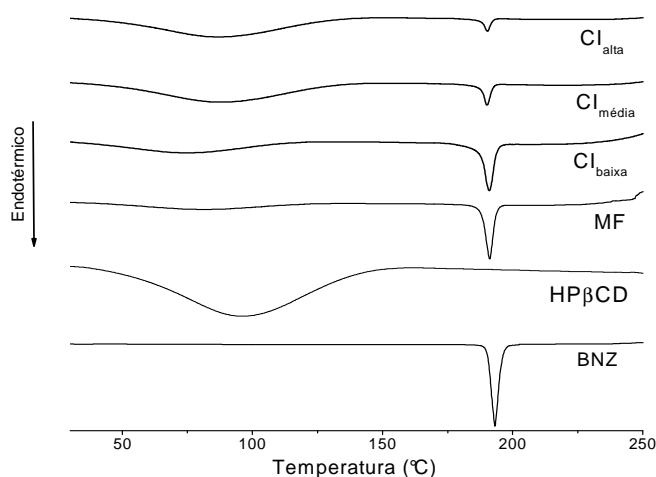


**Figura 5. 1: Difratogramas de raios-X do pó de BNZ, HP $\beta$ CD e seus complexos de inclusão em três níveis de concentração de HP $\beta$ CD [CI<sub>alta</sub>, CI<sub>média</sub> e CI<sub>baixa</sub>].**

As curvas de DSC dos complexos de inclusão produzidos, bem como de seus componentes individuais e da mistura física de fármaco e HP $\beta$ CD, estão representadas na figura 5.2. O perfil térmico do BNZ mostrou um pico de fusão bem definido a 191,3°C,

enquanto que a curva de HP $\beta$ CD revelou um pico largo associado à desidratação. A mistura física desses componentes apresentou os mesmos fenômenos térmicos de seus constituintes originais, com o pico de desidratação da ciclodextrina não visualizado devido à intensidade entálpica do pico de fusão do fármaco, que nessa amostra encontra-se consideravelmente alargado.

Esse efeito na mistura física, conforme comentado anteriormente, pode ser atribuído a interação entre os componentes devido a fenômenos de inclusão decorridos do aquecimento durante a realização do ensaio de DSC. A figura 5.2 mostra também que os complexos de inclusão elaborados nas diferentes proporções apresentam perfis térmicos similares aos da mistura física.



**Figura 5. 2:** Curvas de DSC das amostras de BNZ, HP $\beta$ CD, da mistura física [MF], e dos complexos de inclusão [CI<sub>baixa</sub>, CI<sub>média</sub> e CI<sub>alta</sub>].

Os dados térmicos referentes aos picos de fusão do fármaco estão detalhados na tabela 5.3.

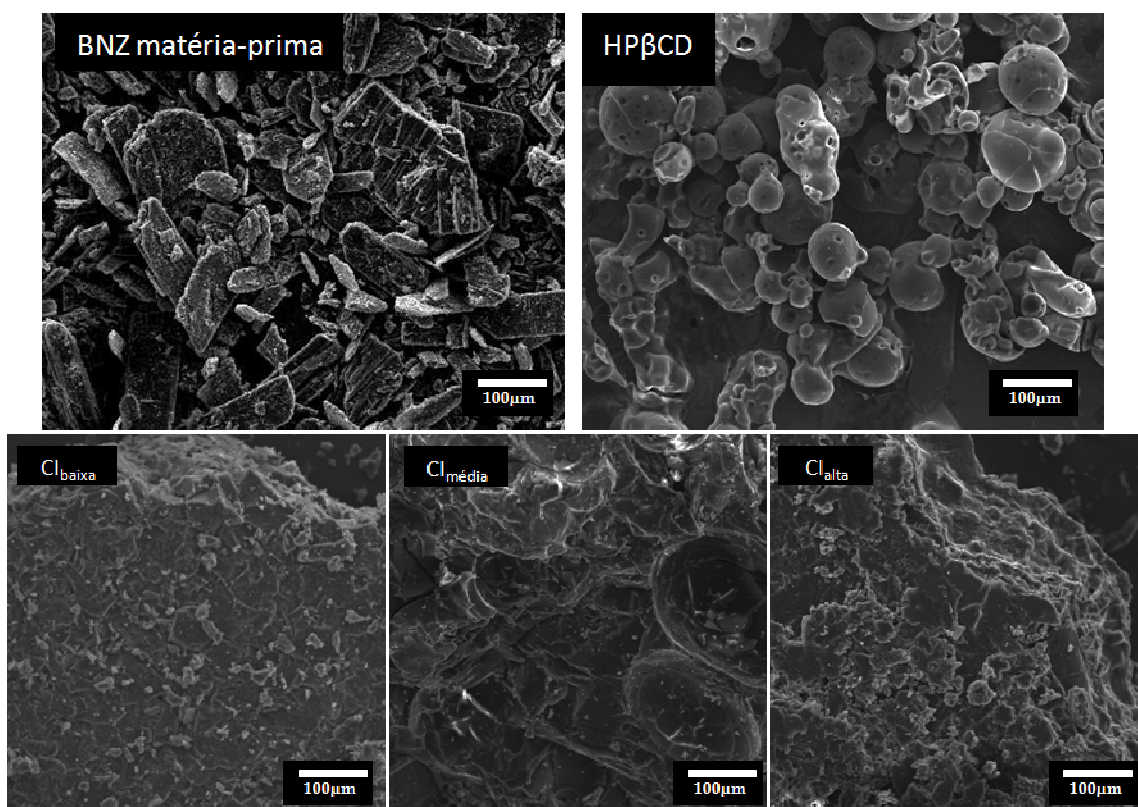
**Tabela 5. 3:** Dados térmicos do BNZ matéria prima, da mistura física [MF] de BNZ e HP $\beta$ CD e dos complexos de inclusão [CI] produzidos.

Amostra	Intervalo de fusão (°C)	T <sub>max</sub> <sup>a</sup> (°C)	$\Delta H_{\text{corrigido}}$ * (J/g)
BNZ	185-202	191,3	138,6
MF	177-198	191,2	145,6
CI <sub>baixa</sub>	171-199	191,0	142,0
CI <sub>média</sub>	171-196	190,1	135,8
CI <sub>alta</sub>	174-196	190,3	97,5

\*entalpia da amostra por grama de fármaco

De acordo com a tabela acima, observou-se que o pico de fusão do fármaco é antecipado em todas as amostras contendo ciclodextrinas, havendo uma redução da temperatura de fusão do fármaco nos CI de concentração alta e média. Observou-se ainda uma redução de mais de 30% na entalpia de fusão na amostra CI<sub>alta</sub>, o que pode sugerir uma redução da cristalinidade devido à complexação do fármaco. Portanto, o grau de interação entre os componentes se intensifica com o aumento da quantidade de ciclodextrina presente na amostra, sugerindo a formação de complexos de inclusão verdadeiros (GOVINDARAJAN et al., 2004).

Mudanças morfológicas dos cristais podem ser empregadas como ferramenta para evidenciar a interação entre moléculas e complexos de inclusão. As fotomicrografias das amostras obtidas por MEV estão representadas na figura 5.3.

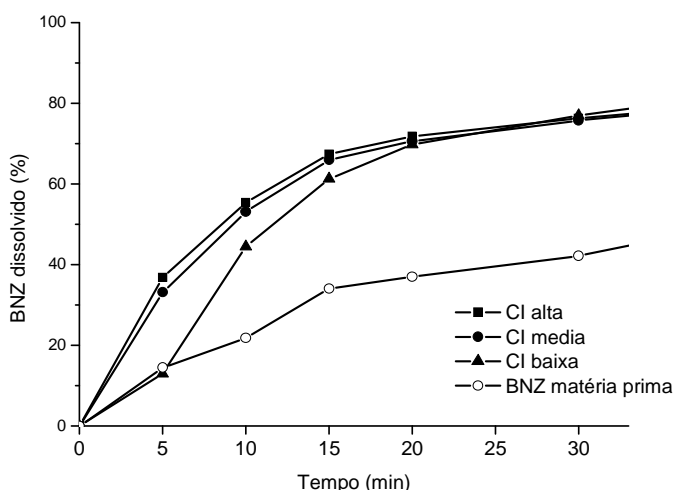


**Figura 5. 3:** Fotomicrografias eletrônicas de varredura de BNZ matéria-prima, da HPβCD e dos complexos de inclusão [CI] produzidos.

Os cristais de BNZ apresentam formato acicular, com muitos fragmentos cristalinos de diferentes tamanhos, enquanto a HPβCD apresenta partículas arredondadas de caráter tipicamente amorfo. Para os complexos de inclusão preparados por malaxagem nas diferentes proporções, notou-se um padrão morfológico bastante diferente de seus constituintes

originais, não sendo possível distinguir os dois constituintes. Esta nova conformação morfológica corrobora a interação existente entre o BNZ e a HP $\beta$ CD e confirma os dados da difração de raios-X do pó e DSC obtidos para essas amostras.

Os perfis de dissolução do BNZ e dos CI estão representados na figura 5.4 e suas respectivas ED<sub>15</sub> encontram-se resumidas na tabela 5.4.



**Figura 5. 4:** Perfis de dissolução das amostras de BNZ matéria-prima, CI<sub>baixa</sub>, CI<sub>média</sub> e CI<sub>alta</sub>.

Comprova-se uma melhora significativa na velocidade de dissolução do BNZ nos complexos formados com HP $\beta$ CD, em comparação com o BNZ matéria-prima. Os valores de ED<sub>15</sub> indicam incrementos na ordem de 100% para os complexos fármaco-ciclodextrina em comparação com o fármaco original (Tabela 5.4).

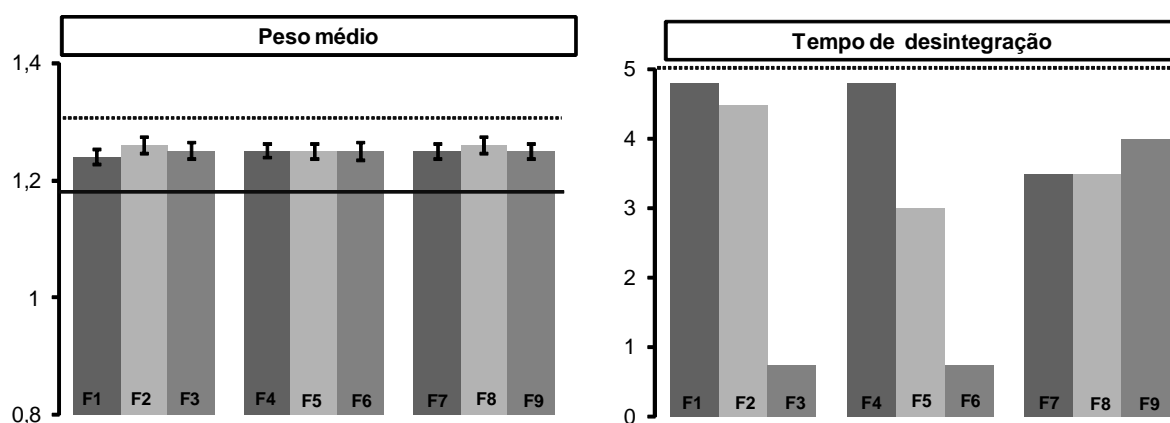
A análise estatística por ANOVA apontou a existência de diferenças significativas entre as diferentes proporções de CI avaliadas. O complexo de inclusão de baixa concentração apresentou resultados de ED<sub>15</sub> inferiores aos das amostras de CI alta e média, que revelaram perfis de dissolução equivalentes.

**Tabela 5. 4:** Valores de ED<sub>15</sub> para o BNZ matéria-prima e complexos de inclusão [CI] produzidos.

Amostra	ED <sub>15</sub> (DP)	Diferenças estatísticas
BNZ mp	17,8 (2,3)	≠
CI baixa	29,4 (1,6)	≠
CI média	39,8 (2,2)	=
CI alta	42,0 (1,4)	=

Os ensaios de peso médio e tempo de desintegração dos comprimidos efervescentes de BNZ estão representados na figura 5.5. Observa-se que todas as formulações atenderam aos limites preconizados pela farmacopéia para ambos os ensaios. Entretanto, nota-se que as formulações contendo maiores quantidades de ciclodextrina apresentaram uma maior dificuldade para se desintegrar (F1, F4 e F7), enquanto que as formulações F3 e F6, que possuíam apenas 8% de HP $\beta$ CD na sua composição, precisaram de menos de 1 minuto para se desintegrar completamente.

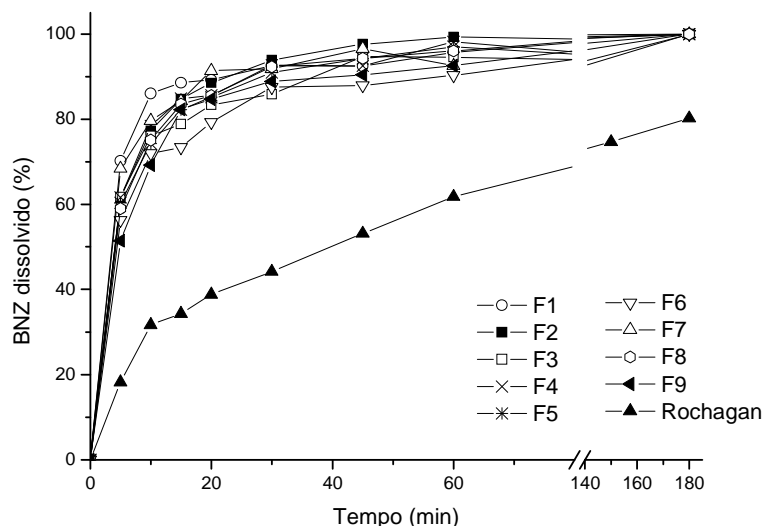
Assim, a presença de CD na formulação parece produzir um efeito negativo sob esse parâmetro. Os resultados mostraram ainda que, as formulações com o nível mais baixo de ME (F7, F8 e F9) mostraram dificuldades de desintegração.



**Figura 5. 5: Resultados dos ensaios de peso médio e tempo de desintegração dos comprimidos efervescentes elaborados.** As linhas tracejadas e contínuas indicam os limites máximos e mínimos estabelecidos pela F. BRAS. IV edição, respectivamente.

As formulações efervescentes mostraram velocidades de dissolução superiores, em comparação com Rochagan<sup>®</sup>, com mais de 80% de fármaco dissolvido em apenas 15min, contra cerca de 30% obtido com o comprimido de Rochagan<sup>®</sup>. É interessante notar que o processo de produção dos comprimidos não comprometeu o perfil de dissolução que o BNZ apresentou nos complexos de inclusão, pelo contrário, a incorporação do CI na matriz efervescente aumentou de forma notável a velocidade de dissolução do fármaco.

Os perfis de dissolução dos comprimidos efervescentes e dos comprimidos comerciais de BNZ (Rochagan<sup>®</sup>) são apresentados na figura 5.6.



**Figura 5. 6: Perfil de dissolução dos comprimidos efervescentes de BNZ e do comprimido comercial Rochagan<sup>®</sup>.**

Apesar de complexos de inclusão com CD ser um recurso muito empregado para melhorar as características biofarmacêuticas de medicamentos, é a primeira vez que a reação de efervescência é usada para melhorar as propriedades de fármacos complexados com CD.

O gás liberado durante a desintegração do comprimido perturba o equilíbrio do sistema possibilitando uma melhoria na molhabilidade das partículas do fármaco. Além disso, este efeito aumenta também a interação física entre os componentes, sugerindo a formação de complexos de inclusão *in situ*, o que poderia explicar o incremento da velocidade de dissolução do fármaco nos comprimidos efervescentes quando comparado com os complexos de inclusão isolados. A ED<sub>15</sub> dos CI (baixa, média e alta) alcançou valores de até 42, enquanto a ED<sub>15</sub> dos comprimidos efervescentes apresentou valores entre 53 e 66 (Tabelas 5.4 e 5.5).

Experimentos de rotina, normalmente, envolvem o uso de apenas um fator de estudo por vez, mantendo os outros fatores constantes. Os resultados obtidos com estes estudos, portanto, não fornecem qualquer informação sobre as possíveis interações entre os fatores estudados. Uma maneira de avaliar a contribuição individual de cada fator, bem como as possíveis interações entre eles é o uso de desenho fatorial (OZER et al, 1993).

O desenho fatorial dos comprimidos efervescentes forneceu uma equação preditiva para cada resposta analisada, de acordo com um modelo ajustado. Um resumo da análise de regressão é mostrado na tabela 5.5. Os modelos ajustados forneceram uma aproximação adequada aos valores reais. A falta de ajuste para as respostas avaliadas foram insignificantes e as variações experimentais podem ser atribuídas somente a erros aleatórios.

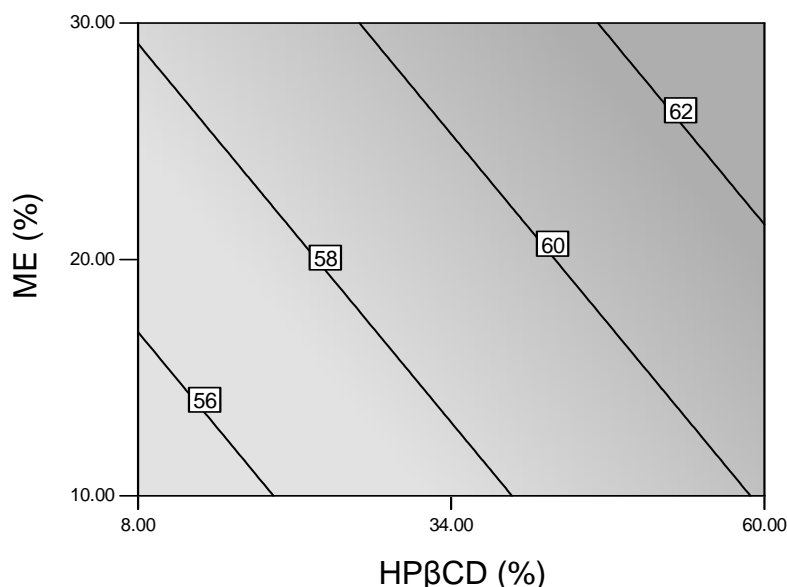
**Tabela 5. 5: Dados de ED<sub>15</sub> e da variação percentual de umidade dos comprimidos efervescentes de BNZ em condições de armazenamento a elevada umidade relativa e a baixa umidade relativa, assim como os parâmetros estatísticos calculados a partir do planejamento experimental fatorial.**

Formulação	ED <sub>15</sub>	Absorção de água a elevada UR em %	Perda de água a baixa UR em %
F1	66,3 ± 4,1	5,38 ± 0,00	-1,64 ± 0,00
F2	60,4 ± 1,5	6,10 ± 0,04	-1,16 ± 0,00
F3	59,1 ± 0,5	2,40 ± 0,11	-0,76 ± 0,00
F4	60,9 ± 0,6	6,11 ± 1,91	-1,37 ± 0,00
F5	58,6 ± 2,3	5,31 ± 1,41	-1,11 ± 0,00
F6	55,0 ± 2,6	2,15 ± 0,63	-0,66 ± 0,00
F7	63,1 ± 1,2	6,57 ± 0,10	-0,45 ± 0,20
F8	58,1 ± 0,1	4,94 ± 0,36	-0,59 ± 0,68
F9	53,9 ± 1,2	2,27 ± 0,03	-1,06 ± 0,01
Modelo ajustado	Linear	Linear	2FI*
Equação do modelo	= 52,42 + 0,10·CD + 0,16·ME	= 1,69 + 0,076·CD	= - 1,36 + 0,021·CD + 0,029·ME - 0,0013·CD·ME
R <sup>2</sup> ajustado	0,43	0,84	0,45
F do modelo	8,26	83,4	3,70
Falta de ajuste	1,81	0,47	0,17

\* modelo de interação entre dois fatores.

A avaliação da  $ED_{15}$  sugeriu o modelo linear como o mais indicado, sendo o valor de F encontrado igual a 8,26, o que demonstra a existência de uma relação significativa entre a velocidade de dissolução do fármaco e a composição da formulação no que se refere aos fatores estudados (concentração de ME e HP $\beta$ CD), existindo apenas 0,31% de chance do modelo selecionado estar equivocado.

O coeficiente de determinação ajustado ( $R^2=0,43$ ) comprovou a adequação do modelo, e o valor de falta de ajuste de 1,81 evidenciou uma relação não significativa relativa ao erro puro. O termo de interação dos dois fatores não foi significativo. O modelo obtido foi usado para desenhar gráficos de contorno, como mostrado na figura 5.7.



**Figura 5. 7: Diagrama de contorno representando a  $ED_{15}$  dos comprimidos efervescentes em função da concentração de HP $\beta$ CD e de ME. Cada linha representa um valor constante de  $ED_{15}$  e as regiões mais escuras indicam os valores de  $ED_{15}$  mais elevados.**

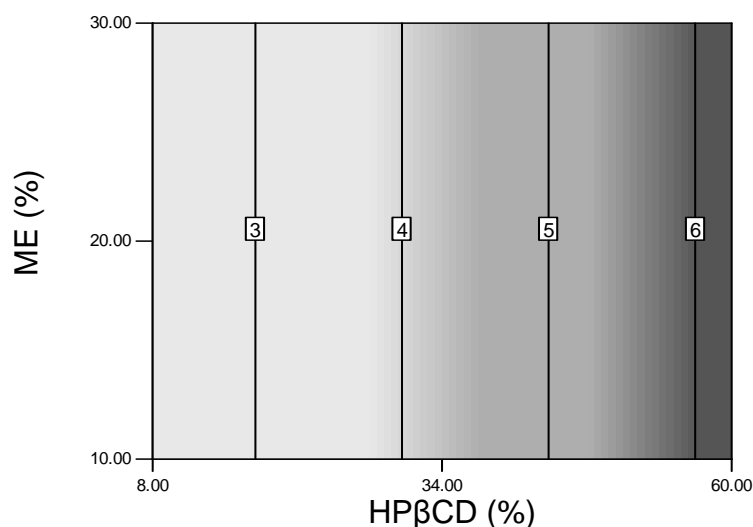
As áreas em cinza representam as quantidades de CD e mistura efervescente que produziram os melhores resultados. De acordo com a equação estabelecida (Tabela 5.5), o sinal positivo dos termos da equação refere-se a um efeito crescente e a magnitude dos coeficientes indica uma contribuição semelhante dos fatores sobre a resposta. Nota-se, a partir do diagrama de contorno, que quantidades maiores de ME e HP $\beta$ CD conduzem a um claro aumento na velocidade de dissolução do BNZ.

A estabilidade física das formulações de comprimidos foi avaliada quanto a sua capacidade de incorporação e perda de água quando submetidas a ambientes de umidade relativa elevada (80%) ou ausência de umidade relativa.



Na condição de elevada umidade relativa, a análise estatística do desenho fatorial mostrada na tabela 5.5 apontou o modelo linear como o mais adequado para a avaliação dos dados. Sendo o valor de F igual a 83,4, o que indica apenas 0,01% de chance do modelo estar equivocado. O valor do coeficiente de determinação ajustado foi de 0,84 e a falta de ajuste de apenas 0,47 foi considerada não significativa, corroborando a validade do modelo.

O diagrama de contorno (Figura 5.8) mostrou que apenas a concentração da ciclodextrina possui influência estatística no parâmetro incorporação de água, o que pode estar relacionada à alta higroscopicidade da HP $\beta$ CD relatada na literatura (SAHARAN et al., 2009). Ao contrário do esperado, o fator concentração da mistura efervescente na formulação não apresentou efeito estatístico, apesar da conhecida higroscopicidade dos componentes efervescentes. O que pode ter contribuído para este achado é o fato de que os excipientes deste estudo foram previamente selecionados de maneira a minimizar a higroscopia da ME. Logo, componentes não-higroscópicos, como ácido tartárico e carbonato de sódio, utilizados na ME equilibraram a higroscopicidade do ácido cítrico e bicarbonato de sódio (AMELA et al., 1996).



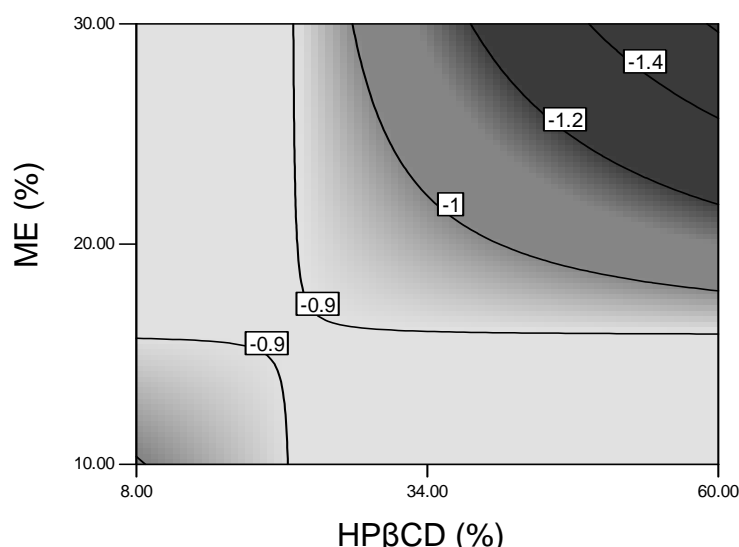
**Figura 5. 8: Diagrama de contorno representando a absorção de água pelos comprimidos efervescentes em função da concentração de HP $\beta$ CD e de ME.** Cada linha representa um valor constante de umidade incorporada em % m/m e as regiões mais escuras indicam os valores de maior absorção de água.

Para a condição de armazenamento dos comprimidos efervescentes em ausência de umidade relativa (próxima a 0%), observou-se uma perda de água das amostras condicionada a ambos os fatores estudados. A ANOVA apontou o modelo 2FI [interação de dois fatores] como o mais apropriado para análise dessa resposta com um F de 3,7, sendo de 93% a chance

de o modelo estar correto (Tabela 5.5). Os valores de coeficiente de determinação ajustado e da falta de ajuste de 0,45 e 0,17, respectivamente, comprovam a validade do modelo.

O termo de interação existente entre os fatores concentração de ciclodextrina e concentração de mistura efervescente apresentaram um coeficiente negativo indicando que ambos os fatores combinados promovem a perda de água dos comprimidos em condições de reduzida umidade atmosférica tornando-os mais friáveis e frágeis.

A partir do diagrama de contorno é possível perceber que as regiões em que predomina somente um dos fatores em altas concentrações, mostraram os melhores resultados em prevenir a perda de água nas amostras (Figura 5.9).



**Figura 5. 9: Diagrama de contorno representando a perda de água pelos comprimidos efervescentes em função da concentração de HPβCD e de ME.** Cada linha representa um valor constante de umidade perdida e as regiões mais escuras indicam os valores de maior perda de água.

## 5.4. CONCLUSÃO

A partir de um estudo comparativo de solubilidade, foi possível aumentar a solubilidade do BNZ na ordem de 20 vezes utilizando HPβCD. Esta variedade de ciclodextrina proporcionou o maior aumento absoluto de solubilidade do fármaco e apresenta vantagens do ponto de vista industrial sendo, portanto selecionada para a elaboração de complexos de inclusão em estado sólido com o BNZ.

Os complexos de inclusão preparados com diferentes proporções de BNZ:HPβCD revelaram fortes indícios de complexação, apresentando importantes incrementos no perfil de

dissolução do fármaco. Além disso, o efeito da adição da mistura efervescente aos comprimidos elaborados com tais complexos potencializou ainda mais a dissolução do fármaco, promovendo a solubilização completa da dose em estudo em aproximadamente 30 minutos.

A realização de um desenho fatorial permitiu um bom conhecimento dos fenômenos estudados com o mínimo de tempo e custo material. Foi estudada a contribuição de dois fatores: concentração de HP $\beta$ CD e concentração de ME na formulação de comprimidos. O estudo revelou que altas concentrações de mistura efervescente e ciclodextrina conduzem a um aumento da velocidade de dissolução do benznidazol. Entretanto, altas concentrações de ciclodextrina parecem retardar a efervescência, elevando o tempo de desintegração dos comprimidos e também tornado as formulações mais vulneráveis a variações de umidade atmosférica.

Logo, a formulação otimizada que alcançou excelente melhora na velocidade de dissolução do benznidazol, bem como um resultado adequado para controle de qualidade e estabilidade física foi estabelecida contendo HP $\beta$ CD e ME em níveis médios de concentração, com cerca de 48% e 20%, respectivamente.

Esta etapa de desenvolvimento de novas formulações a base de BNZ, demonstrou que incrementos significativos na velocidade de dissolução desse fármaco podem ser alcançados empregando-se técnicas simples de micronização, tanto os comprimidos convencionais quanto comprimidos efervescentes desenvolvidos que mostraram desempenho de solubilização do BNZ superior ao apresentado pela formulação comercial disponível.

A fim de se avaliar o impacto desses incrementos observados na velocidade de dissolução do BNZ na resposta terapêutica desse fármaco, seguiu-se com a formulação selecionada no capítulo anterior, para os estudos *in vivo* conduzidos conforme descrito na próxima parte deste trabalho.

**PARTE 3:**  
*Estudos in vivo*

---

---

---

## **Capítulo 6: Avaliação da eficácia dos comprimidos de benznidazol, desenvolvidos pela técnica de recristalização por mudança de solvente, no tratamento da doença de Chagas experimental.**

### **6.1. INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, importantes avanços no conhecimento da biologia e da bioquímica do *T. cruzi* tem sido reportados, permitindo identificar com mais segurança potenciais alvos quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas (URBINA; DOCAMPO, 2003). Dentre os diferentes alvos já estudados, destacam-se os inibidores da biossíntese de esteróis, como cetoconazol, itraconazol, albaconazol, posaconazol e ravuconazol. Alguns destes fármacos, como o posaconazol já disponível para o tratamento de infecções fúngicas, já foi usado no tratamento de um caso humano e deve ser avaliado em triagem clínica (ARAÚJO et al., 2000; TOLEDO et al., 2003; GUEDES et al., 2004; MOLINA et al., 2000; DINIZ et al., 2010). Dentre as principais vantagens desses compostos, em relação à terapia atualmente usada, incluem-se: (i) alta eficácia no tratamento da doença de Chagas experimental, em ambas as fases aguda e crônica; (ii) larga distribuição tecidual, característica extremamente importante, especialmente durante a fase crônica da doença; (iii) baixa toxicidade para mamíferos, devido ao seu seletivo mecanismo de ação. As limitações estão relacionadas à complexidade e ao custo de fabricar esses novos compostos, o que torna o tratamento extremamente oneroso.

A literatura mostra que apesar do grande número de moléculas descobertas com potencial aplicação na terapêutica da doença de Chagas, somente três compostos avançaram para estudos clínicos, o alopurinol, o itraconazol e o fluconazol (SOEIRO; DE CASTRO, 2009). Desta maneira, o benznidazol permanece como o único recurso terapêutico disponível para combater a doença de Chagas, apesar de sua limitação no tratamento crônico da doença (CANÇADO, 2002).

Diante disso, ganha espaço as propostas de estudo que visam melhorar a utilização do BNZ, seja em estudos que o utilizem combinado com outros fármacos (FRANCISCO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2000), seja em trabalhos dedicados a desenvolver sistemas de liberação mais avançados capazes de superar seus problemas de biodisponibilidade (LAMA et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Neste contexto, o estudo proposto teve como objetivo a avaliação biológica dos comprimidos de BNZ desenvolvidos pela técnica de recristalização por mudança de solvente para tratar a doença de Chagas utilizando modelo murino infectado com a cepa Y do *T. cruzi*.

## 6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1. Modelo animal

Neste trabalho foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, com idade aproximada de 30 dias, pesando de 18 a 23g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto. Durante os experimentos os animais, de cada grupo experimental, foram mantidos em gaiolas contendo 6 camundongos (protocolo 1) e 10 camundongos (protocolo 2), em condições de dieta e água *ad libitum*.

Os animais utilizados foram inoculados, por via intraperitoneal, com  $5 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. A confirmação da infecção ocorreu no 4º dia após a inoculação.

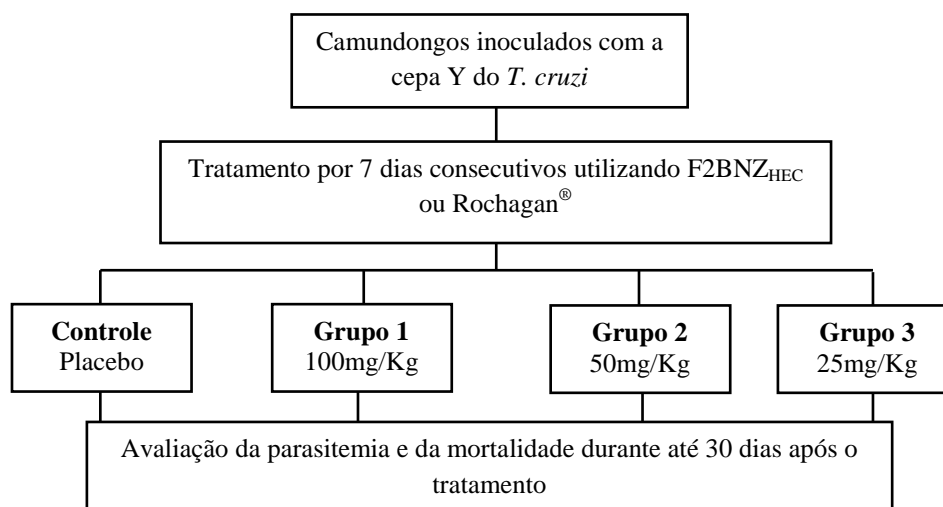
### 6.2.2. Tratamento

Os animais foram tratados com a formulação de comprimidos F2BNZ<sub>HEC</sub> a base de microcristais de BNZ selecionada na fase anterior e com o medicamento disponível no mercado contendo BNZ (Rochagan®). As formulações foram administradas por gavagem (via oral), utilizando uma suspensão de goma arábica a 4%.

O tratamento foi iniciado imediatamente após a detecção do parasito pelo exame de sangue a fresco.

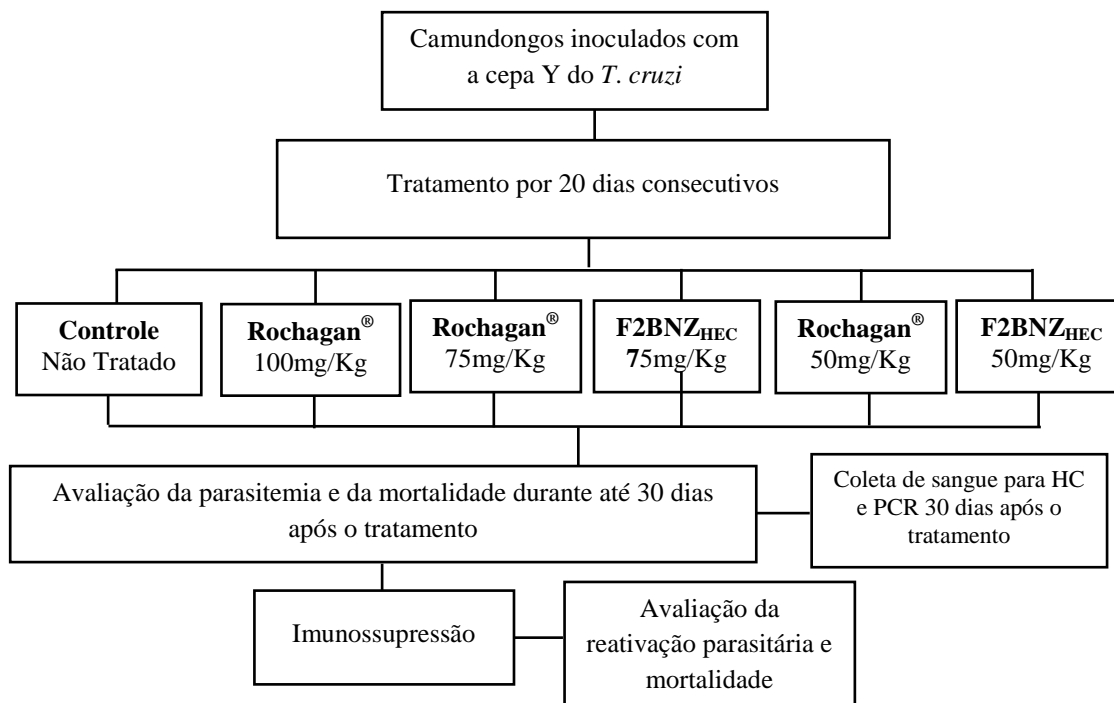
### 6.2.3. Protocolos de estudo

Com o objetivo de avaliar a eficácia farmacológica da formulação desenvolvida contendo microcristais de BNZ, comparando-a com o medicamento disponível no mercado, foram utilizados dois protocolos de estudo, conforme descritos nas figuras 6.1 e 6.2.



**Figura 6. 1: Protocolo de estudo 1 utilizado no tratamento da doença de Chagas experimental por 7 dias.**

O protocolo de estudo 1 [PE1] analisou a resposta terapêutica dos grupos tratados com doses decrescentes de BNZ por um período curto (7 dias), buscando avaliar a redução da parasitemia na fase aguda. A mortalidade foi avaliada durante o tratamento e após 30 dias seguintes.



**Figura 6. 2: Protocolo de estudo 2 utilizado no tratamento da doença de Chagas experimental por 20 dias.**

No protocolo de estudo 2 [PE2], os animais foram submetidos a um ciclo de tratamento completo (20 dias consecutivos) com o objetivo de avaliar a cura parasitológica através dos seguintes testes: Exame de sangue a fresco [ESF], Hemocultura [HC] e Reação em cadeia da Polimerase [PCR]. A mortalidade também foi avaliada durante e após o período de tratamento (ROMANHA et al., 2010).

#### Ciclos de imunossupressão

Os ciclos de imunossupressão iniciaram-se 30 dias após o tratamento (no 53º dia de experimento) com a finalidade de confirmar a ausência de parasitos após o tratamento. Em cada ciclo, foi administrado diariamente por via intraperitoneal, 0,05mL de ciclofosfamida (Genuxal<sup>®</sup>) na concentração de 20mg/mL durante três ciclos consecutivos. Cada ciclo é composto de 7 dias sendo 4 dias consecutivos de administração do medicamento e 3 dias de pausa entre um ciclo e outro. A parasitemia foi avaliada durante o período de imunossupressão e por mais 10 dias posteriores.

### **6.2.4. Testes parasitológicos**

#### *6.2.4.1. Exame de Sangue a Fresco [ESF]*

Este teste consistiu em quantificar a parasitemia no sangue coletado da cauda do animal, seguindo a técnica proposta por Brener (1962) (BRENER, 1962). Os dados foram apresentados como *Log* da média dos valores máximos de parasitemia observados em cada animal dos grupos experimentais.

#### *6.2.4.2. Hemocultura [HC]*

Para o teste de hemocultura, 0,4 a 0,6mL de sangue de todos os camundongos tratados foi coletado assepticamente pelo plexo venoso retro-orbital e distribuídos em tubos cônicos de 15mL contendo 3mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Os tubos foram incubados em estufa a 28°C. As hemoculturas foram examinadas aos 30, 60, 90 e 120 dias após a sua realização (CHIARI et al., 1989).



#### 6.2.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase [PCR]

Foram coletados 200 $\mu$ L de sangue através do plexo venoso retro-orbital de cada animal, e acondicionados em 200 $\mu$ L de solução de Guanidina-HCl/EDTA a 6,0M e pH 8,0. As amostras de sangue em Guanidina/EDTA foram mantidas à temperatura ambiente e após 7 dias foram fervidas em banho-maria a 100°C por 15 minutos (BRITTO et al., 1993). O lisado obtido foi estocado a temperatura ambiente antes da extração do DNA.

Para a extração do DNA utilizou-se a técnica proposta por Gomes e colaboradores (1998). Amostras de 200 $\mu$ L do lisado foram colocadas em microtubos de 1,5mL (Eppendorf®) para serem desproteinizados com 200 $\mu$ L de solução fenol:clorofórmio (1:1 v/v). A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 10.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e ao sedimento foram adicionados 300 $\mu$ L de clorofórmio e centrifugado novamente por 5 minutos a 10.000rpm.

O sobrenadante foi transferido para microtubos (Eppendorf®) contendo 20 $\mu$ L de acetato de sódio a 10mM, e em seguida foi adicionado 450 $\mu$ L de etanol absoluto gelado. Essa mistura foi homogeneizada lentamente e mantida em banho de gelo por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e após a volatilização do etanol absoluto, o DNA obtido foi resuspendido em 20 $\mu$ L de água mili-Q e mantido a temperatura de 4°C antes da amplificação (GOMES et al., 1998).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 9 $\mu$ L contendo 5X Green GoTaq® (Promega®), MgCl<sub>2</sub> a 2,5mM (Promega®), 2,5mM de dNTP Mix® (Invitrogen), 1,0 unidade de Taq DNA polimerase a 5u/ $\mu$ L (GoTaq® Flexi), e os primers 121 (5'- AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA - 3') e 122 (5'- GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT - 3').

Foram realizados 35 ciclos de amplificação em um termociclador automático (MasterCycler®). As condições da reação foram: desnaturação do DNA a 95°C por 1 minuto (com etapa inicial mais longa por 5 minutos), anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto com etapa final de 10 minutos.

As etapas de extração e amplificação do DNA foram monitoradas com controles negativos (amostras de sangue de camundongos não infectados) e positivos (sangue de animais infectados da fase aguda). Além disso, para evitar contaminações, cada etapa da

reação foi realizada em ambientes separados, utilizando reagentes e equipamentos destinados exclusivamente para cada uma das mesmas.

O resultado da amplificação pela PCR foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% revelados por uma solução de prata (SANTOS et al., 1993). O tamanho das bandas amplificadas foi monitorado pela utilização de marcador de peso molecular igual a 100pb. Após a eletroforese, o gel foi fixado em solução de etanol a 10% e ácido acético a 0,5% por 5 minutos, sob agitação. Em seguida, esta solução foi desprezada e o gel foi corado com uma solução de nitrato de prata a 0,2% por 10 minutos sob agitação. Posteriormente, o gel foi lavado por 1 minuto em água destilada e revelado em solução de NaOH a 0,75M e formaldeído a 0,1M, sob agitação, até o aparecimento das bandas. Novamente o gel foi transferido para a solução fixadora e fotografado para documentação.

Os dados de PCR foram apresentados como porcentagem de cura (%).

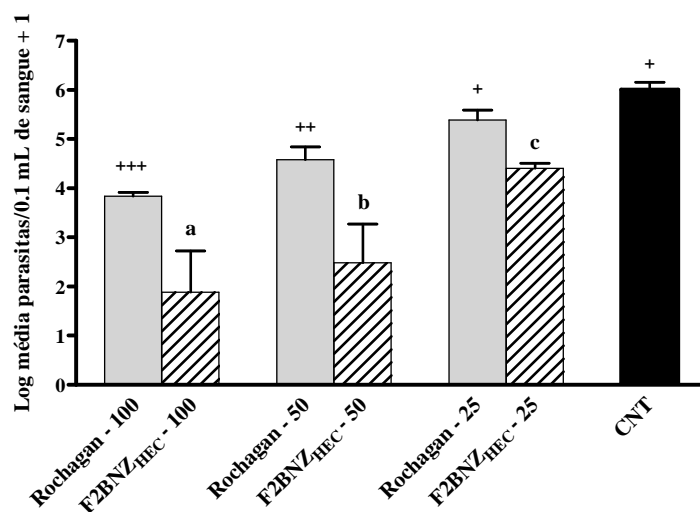
#### **6.2.5. Análise estatística dos dados**

A análise estatística dos dados foi realizada usando-se o programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software®). As médias dos picos máximos de parasitemia observados para os animais infectados foram comparados por meio de análise de variância dos dados [ANOVA] e pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

### **6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **6.3.1. Protocolo Experimental 1**

A figura 6.3 mostra o *Log* do pico máximo de parasitemia observado entre os animais infectados e tratados com o Rochagan® e com a formulação F2BNZ<sub>HEC</sub>.



**Figura 6. 3:** Log dos picos máximos de parasitemia apresentados por camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com diferentes doses de Rochagan® e F2BNZ<sub>HEC</sub>.

Considerando as doses 100 e 50mg/Kg de peso corporal, as duas formulações testadas induziram uma redução significativa no pico máximo de parasitemia quando comparado com o grupo controle infectado não tratado [CNT], sendo  $p < 0,05$  para os grupos tratados com Rochagan® e  $p < 0,001$  para os grupos tratado com F2BNZ<sub>HEC</sub>. Dentre os grupos tratados com a dose de 25mg/Kg, somente o grupo tratado com a formulação F2BNZ<sub>HEC</sub> apresentou uma redução significativa na parasitemia quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

Como previsto, observou-se uma clara relação entre a dose administrada e os níveis de parasitemia. Para todas as doses utilizadas, a redução da parasitemia foi mais pronunciada nos grupos tratados com F2BNZ<sub>HEC</sub> quando comparado com os grupos tratados com Rochagan® em cada dose.

Os demais parâmetros biológicos analisados confirmaram o melhor desempenho terapêutico da formulação F2BNZ<sub>HEC</sub> quando comparada, na mesma dose, com a formulação comercial.

De acordo com os dados da tabela 6.1, dentre os grupos tratados com o Rochagan®, apenas a dose de 100mg/kg de peso corporal foi capaz de suprimir a parasitemia no período estudado, enquanto que o tratamento com F2BNZ<sub>HEC</sub> foi capaz de suprimir a parasitemia em 100% dos animais, dos grupos tratados com as doses de 100 ou 50mg/kg de peso corporal, atingindo ainda 33% de supressão com a dose 25mg.

**Tabela 6. 1: Parâmetros biológicos avaliados em camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente com as formulações de F2BNZ<sub>HEC</sub> e Rochagan<sup>®</sup> durante 7 dias.**

Grupos n=6	Parâmetros avaliados		
	Supressão da parasitemia <sup>a</sup>	Tempo de supressão da parasitemia <sup>b</sup>	Mortalidade <sup>a</sup>
Rochagan -100	6/6 (100%)	10,3±6,0	0/6
F2BNZ <sub>HEC</sub> -100	6/6 (100%)	22,0±9,2	0/6
Rochagan -50	0/6 (0%)	ND	1/6
F2BNZ <sub>HEC</sub> -50	6/6 (100%)	13,7±12,8	0/6
Rochagan -25	0/6 (0%)	ND	2/6
F2BNZ <sub>HEC</sub> -25	2/6 (33%)	1,5±0,7	0/6
CNT	ND	ND	6/6

<sup>a</sup> dados expressos como n° de animais com efeito observado/n° total de animais; <sup>b</sup> dados expressos como média do tempo em dias ± DP, sendo 30 dias o tempo máximo estipulado; CNT = controle infectado não tratado, ND = dado não disponível.

O tempo para a reativação da parasitemia após o tratamento também foi dependente da dose e da formulação (Tabela 6.1). Considerando-se a maior dose administrada (100mg/kg de peso corporal), os animais tratados com o Rochagan<sup>®</sup> apresentaram reativação da parasitemia 10 dias após o término do tratamento, enquanto a administração do BNZ micronizado (F2BNZ<sub>HEC</sub>) induziu uma supressão parasitária de 22 dias. A dose de 50mg/kg de F2BNZ<sub>HEC</sub> conseguiu suprimir a parasitemia nos animais por até 13 dias após o término do tratamento.

O protocolo adotado para este estudo com um curto período de tratamento (7 dias) não é suficiente para promover a cura parasitológica dos animais, logo a reativação da parasitemia após o período de supressão já era esperado. Esse protocolo foi útil para comparar a formulação desenvolvida com a formulação comercial e para estabelecer relações dose-resposta com a formulação desenvolvida.

Outro resultado foi encontrado para F2BNZ<sub>HEC</sub> em relação à mortalidade dos animais nos grupos tratados. Enquanto apenas a dose de 100mg/kg de peso corporal de Rochagan<sup>®</sup> foi capaz de impedir a morte dos animais durante o período estudado, os comprimidos F2BNZ<sub>HEC</sub> promoveram 100% de sobrevivência para todos os grupos tratados (100, 50 e 25mg/Kg) (Tabela 6.1).

Os resultados encontrados nos ensaios em animais corroboram os estudos *in vitro* realizados com os comprimidos desenvolvidos pela técnica de recristalização por mudança de solvente. Pode-se concluir que a rápida velocidade de dissolução do fármaco verificada anteriormente, repercute na sua absorção biológica, proporcionando uma importante melhora terapêutica no tratamento experimental da doença de Chagas.

Esse possível incremento de biodisponibilidade do fármaco em estado micronizado sugere a possibilidade de reduzir as doses de BNZ utilizadas e manter a máxima resposta terapêutica de supressão parasitológica. Tal redução poderá proporcionar importante impacto na diminuição dos efeitos tóxicos do fármaco e no melhor cumprimento da terapêutica.

### 6.3.2. Protocolo Experimental 2

De modo a avaliar a eficácia farmacológica da formulação F2BNZ<sub>HEC</sub> durante um ciclo completo de tratamento (20 dias), foram utilizadas as doses descritas na figura 6.2, excluindo-se a dose de 25mg/Kg, incapaz de reduzir a parasitemia de maneira satisfatória, e adicionando-se a dose de 75mg/Kg, um valor médio na faixa estudada, e que de acordo com o estudo inicial (PE1), poderia apresentar resultados semelhantes à dose 100mg/Kg.

A tabela 6.2 resume os dados obtidos na avaliação do número de doses necessárias para suprimir a parasitemia, do tempo em que a supressão foi mantida e da mortalidade durante o tratamento e após um período de 30 dias.

**Tabela 6. 2: Parâmetros biológicos avaliados em camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente com as formulações F2BNZ<sub>HEC</sub> e Rochagan<sup>®</sup> durante 20 dias.**

Grupos (n=6)	Parâmetros avaliados		
	Número de doses para início da supressão <sup>a</sup>	Tempo de supressão da parasitemia <sup>b</sup>	Mortalidade durante e após 30 dias de tratamento
Rochagan -100	1,4±0,7	26,1±8,3	0/10
Rochagan -75	1,4±0,7	11,4±10,0	1/10
F2BNZ <sub>HEC</sub> -75	1,4±0,7	17,5±11,5	1/10
Rochagan -50	3,8±3,1	14,6±12,8	0/10
F2BNZ <sub>HEC</sub> -50	2,2±2,5	19,7±12,1	0/10
CNT	ND	ND	10/10

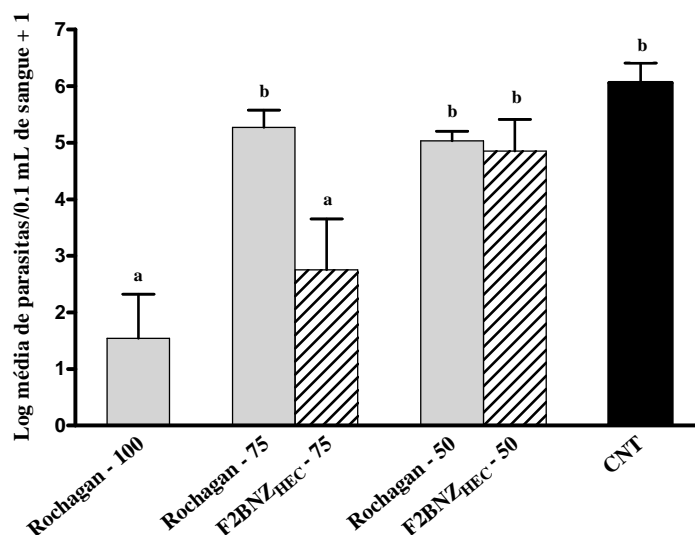
<sup>a</sup> dados expressos como média ± DP; <sup>b</sup> dados expressos como média do tempo em dias ± DP, sendo 30 dias o tempo máximo contados a partir do fim do tratamento; <sup>c</sup> dados expressos como n° de animais com efeito observado/n° total de animais, sendo 30 dias o tempo máximo contados a partir do fim do tratamento. CNT = controle infectado não tratado, ND = dado não disponível.

Nota-se que com o mesmo número de doses obteve-se a supressão da parasitemia nos grupos tratados com Rochagan<sup>®</sup> (100 e 75mg/Kg) e F2BNZ<sub>HEC</sub> (75mg/Kg). A dose de 50mg/Kg, para ambos os tratamentos, apresentou um desempenho abaixo do esperado, sendo necessário um número maior de doses para inibir a parasitemia.

Os resultados de tempo de supressão da parasitemia revelaram um melhor desempenho da formulação de Rochagan<sup>®</sup> na dose de 100mg/Kg, que apresentou um tempo de supressão de aproximadamente 26 dias. Para a dose de 75mg/Kg, o tempo de supressão atingido com F2BNZ<sub>HEC</sub> (17,5) foi superior ao tempo de inibição conseguido com o Rochagan<sup>®</sup> nessa mesma dose (11,4), porém, inferior ao obtido pelo Rochagan<sup>®</sup> na dose referencia de 100 mg/Kg.

Os dados de mortalidade mostraram resultados similares aos encontrados no PE1. Tanto a formulação F2BNZ<sub>HEC</sub> quanto o Rochagan<sup>®</sup> foram capazes de prevenir a mortalidade da maioria dos animais tratados em comparação com o grupo controle, em todas as doses testadas (Tabela 6.2).

Com o intuito de se confirmar a ausência de parasitos durante o período de supressão mostrado na tabela 6.2, procedeu-se a imunossupressão dos animais a partir do 30º dia após o fim do tratamento. Os dados de reativação são mostrados na figura 6.4, como o *Log* dos picos máximos de parasitemia, obtidos pela média dos picos máximos de parasitemia que cada animal apresentou após os ciclos de imunossupressão.



**Figura 6. 4: Log dos picos máximo de parasitemia de camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, tratados por via oral com as formulações F2BNZ<sub>HEC</sub> e Rochagan<sup>®</sup>, nas doses 50 e 100mg/Kg de peso corporal.**

Os dados de parasitemia (Figura 6.4) mostraram que após os ciclos de imunossupressão, os grupos tratados com 50mg/Kg de F2BNZ<sub>HEC</sub> ou Rochagan<sup>®</sup> e com a dose de 75mg/Kg de Rochagan apresentaram uma carga parasitária semelhante a do grupo controle [CNT], evidenciando a falha terapêutica desses tratamentos.

Os animais tratados com F2BNZ<sub>HEC</sub> 75mg/Kg apresentaram um resultado de inibição da parasitemia superior ao do Rochagan com a mesma dose, contudo inferior ao conseguido com a dose referência de Rochagan<sup>®</sup> (100mg/Kg). Nenhum dos grupos avaliados revelou-se capazes de curar todos os animais. A reativação da parasitemia observada mesmo no grupo tratado com BNZ 100mg/Kg era esperada, uma vez que a cepa Y utilizada neste estudo mostra-se parcialmente resistente ao BNZ (FILARDI; BRENER, 1987).

Ensaio parasitológico complementares foram realizados a fim de se confirmar a cura parasitológica dos animais que não reativaram a parasitemia após os ciclos de imunossupressão. Os dados fornecidos pelo exame de HC e de PCR estão detalhados na tabela 6.3.

**Tabela 6. 3: Dados dos testes de HC e PCR obtidos de camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, após 30 dias de tratamento com F2BNZ<sub>HEC</sub> e Rochagan<sup>®</sup>.**

Grupo (n=10)	Animais com reativação da parasitemia <sup>a</sup>	HC e/ou PCR (+) <sup>b</sup>	% de cura
BNZ 100mg/Kg	3/10	3/10	70%
BNZ 75mg/Kg	9/9	9/9	0
F2BNZ <sub>HEC</sub> 75mg/Kg	5/9	6/9	33,3%
BNZ 50mg/Kg	10/10	10/10	0
F2BNZ <sub>HEC</sub> 50mg/Kg	9/10	9/10	10%

<sup>a</sup> Números de animais que apresentaram parasitemia após os ciclos de imunossupressão

<sup>b</sup> Animais que apresentaram exame de HC e PCR positivo/número total de animais no grupos.

Confirmando os resultados anteriores, os dados de hemocultura apresentados na tabela 6.3 revelaram que o número de animais com exame positivo foi muito maior nos grupos tratados com Rochagan<sup>®</sup> 50 e 75mg/Kg em comparação com as mesmas doses de F2BNZ<sub>HEC</sub>. Ficando evidente a melhora da ação do BNZ obtida com a formulação F2BNZ<sub>HEC</sub>.

Os dados de PCR, considerados mais conclusivos em relação à cura parasitológica, revelaram que houve cura em 70% dos animais tratados com o BNZ 100mg/Kg, não havendo cura em nenhum dos animais tratados com Rochagan<sup>®</sup> em doses inferiores. Verificou-se cura de 33,3% no grupo tratado com F2BNZ<sub>HEC</sub> 75mg/Kg e de 10% dos animais tratados com 50mg/Kg de F2BNZ<sub>HEC</sub>. Estes dados sugerem que as mudanças observadas nos perfis de

dissolução do BNZ nas etapas iniciais deste estudo, refletiram positivamente na biodisponibilidade do BNZ e conseqüentemente, na sua ação terapêutica.

#### **6.4. CONCLUSÃO**

A partir de modelos experimentais para a doença de Chagas foi possível demonstrar que as melhorias nas características de solubilidade do BNZ, conseguidas através do desenvolvimento farmacotécnico de microcristais obtidos pela técnica recristalização por mudança de solvente, foram capazes de proporcionar bons resultados terapêuticos em relação a formulação comercial na mesma dose.

A formulação F2BNZ<sub>HEC</sub> desenvolvida conseguiu reduzir a parasitemia e a mortalidade mesmo em doses sub-terapêuticas, além de promover incrementos nos percentuais de cura parasitológica, em relação a doses equivalentes do tratamento comercial atualmente disponível, também a base de BNZ.

O estudo realizado confirma a promissora estratégia adotada recentemente de desenvolver tratamentos mais eficazes para a doença de Chagas, baseados na elaboração de sistemas de administração melhores estruturados e capazes de superar as barreiras biofarmacêuticas, limitantes para o desempenho satisfatório de potentes fármacos como o BNZ. Neste contexto, os microcristais de BNZ preparados neste estudo representam um importante avanço na terapêutica antichagásica com o BNZ, embora a formulação necessite ser aprimorada de forma a aumentar sua viabilidade clínica.



### CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- Os estudos de pré-formulação realizados com o benznidazol originaram uma ampla base de dados, em grande parte inédita, que servirão para delinear os parâmetros de qualidade desse fármaco e nortearão o desenvolvimento futuro de dispositivos mais avançados de administração desse princípio ativo.
- A produção de complexos de inclusão entre benznidazol e ciclodextrinas proporcionou resultados expressivos de aumento na solubilidade e no perfil de dissolução do fármaco. A introdução desses complexos em matrizes efervescentes de comprimidos potencializou a solubilização do benznidazol e cumpriu os requisitos farmacopéicos de qualidade.
- O método de micronização de fármacos através da recristalização por mudança de solvente mostrou-se capaz de produzir partículas de benznidazol de tamanho reduzido, estáveis física e quimicamente e capazes de solubilizar-se rapidamente. Essa técnica propiciou o incremento no perfil de dissolução dos microcristais de benznidazol, não afetado pelo processo de compressão.
- Os recursos farmacotécnicos alternativos, usados neste estudo, se mostraram como técnicas simples, de baixo custo e que perfeitamente podem ser adaptadas à escala de produção industrial.
- Os estudos de atividade biológica em modelo murino infectado com a cepa Y do *T. cruzi* conduzidos utilizando comprimidos de benznidazol desenvolvidos pela técnica de recristalização por mudança de solvente mostraram aumento nos percentuais de cura parasitológica dos animais tratados com a formulação desenvolvida, quando comparandos com o tratamento comercial disponível.
- Espera-se que os resultados deste estudo embasem novas pesquisas em busca de formulações mais efetivas para o tratamento de milhões de pessoas infectadas com a doença de Chagas em toda a América Latina, que ainda precisam de ajuda.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEEM, O.; KUCHEKAR, B.; PORE, Y.; LATE, S. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, n.3, p.535-540, 2008.

ALLEN Jr, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed. 775 p., 2007.

ALLEN Jr., L. V. Dosage form design and development. **Clinical Therapeutics**, v.30, n.11, 2008.

ALTCLAS, J.; SINAGRA, A.; DICTAR, M.; LUNA, C.; VERÓN, M.T.; DE RISSIO, A. M.; GARCÍA, M. M.; SALGUEIRA, C.; RIARTE, A. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. **Bone marrow transplantation**, v.36, p.123-129, 2005.

ALTONEN, J.; ALLESØ, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V. Solid form screening - A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p. 23-37, 2009.

AMELA, J.; SALAZAR, R.; CEMELI, J. Effervescent Tablets of Ascorbic Acid. I. Physical Study of the Possible components to Be Used. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.22, n.5, p.407-416, 1996.

AMIDON, G. L., LENNERNAS, H., SHAH, V. P., CRISON, J. R. A theoretical basic for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The trypanosoma cruzi-host cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p.819-823, 2005.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE; Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 02 de junho de 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>.

ARAÚJO, A. A. S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L. P. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n.2, p. 303-314, 2005.

ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E. S.; BRENER, Z. A combination of benzimidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, n.6, p.819-824, 2000.

AULTON, Michael E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v.362, n.9394, p.1469-1480, 2003.

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

BERTOL, C. D.; CRUZ, A. P.; STULZER, H. K.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, doi: 10.1007/s10973-009-0540-3, 2009.

BEYRER, C.; VILLAR, J. C.; SUWANVANICHKIJ, V.; SINGH, S.; BARAL, S. D.; MILLS, E. J. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. **The Lancet**, v. 370, p. 619-627, 2007.

BRANDÃO, F.; TAGIARI, M.; SILVA, M.; BERTI, L.; STULZER, H. Physical-chemical characterization and quality control of spironolactone raw material samples. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.42, n.6, p. 368-376. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Balanço das Ações da Saúde. 85p., 2003

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual review of microbiology**, v. 27, p. 347-383, 1973.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p., 2000.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.7, p.645-666. 2007.

BRITO, N. M.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POSELE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 126-146, 2003.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P.; MOREL, C. M. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.171-172, 1993.

BRUNI, G.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.; MARINI, A. Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, doi: 10.1007/s10973-009-0382-z, 2009.

CALDAS, I. S.; TALVANI A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C. M.; LANA, M.; GUEDES, P. M. M.; BAHIA, M. T. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces

parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Research**, v.103, n.2, p. 413-421, 2008.

CALDAS, S.; SANTOS, F. M.; LANA, M.; DINIZ, L. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VELOSO, V. M.; BAHIA, M. T. Trypanosoma cruzi: Acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. **Experimental Parasitology**, v.118, p.315-323, 2008a.

CALLAHAN, J. C.; CLEARY, G. W.; ELEFANT, M.; KAPLAN, G.; KENSLER, T.; NASH, R. A. Equilibrium Moisture Content of Pharmaceutical Excipients. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.8, n.3, p. 355-369, 1982.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.1, p. 29-37, 2002.

CAPES, J. S.; CAMERON, R. E. Contact line crystallization to obtain metastable polymorphs. **Crystal Growth & Design**, v.7, p.108-112, 2007.

CARR, R.L. Classifying flow properties of solids, **Chemical Engineering**. v.1, p.69-72, 1965.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHIARI, E.; DIAS, J. C.; LANA, M.; CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, n.1, p.19-23, 1989.

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

CLAS, S. D.; DALTON, C. D.; HANDCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

COLORCON. Starch 1500<sup>®</sup> Partially Pregelatinized Maize Starch: *Flexibility for performance*, 1999.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 55, n. 1, 2003. Disponível em: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252003000100022&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100022&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 10 de maio de 2010.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n. 1, p.3-24, 2002.

CUADRADO, J. A., FORN, M. P. **Validación de métodos analíticos**. Barcelona: AEFI, 2001.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; DACUNHA-MARINHO, B; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Characterization of  $\beta$ -Lapachone and Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin Solid-state Systems. **AAPS PharmSciTech.**; v. 8, n. 3, E1-E10, 2007.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Compatibility of the antitumoral  $\beta$ -lapachone with different solid dosage forms excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 590-598, 2007a.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.1-9, 2007.

CUNHA-FILHO, M. S., MARTÍNEZ-PACHECO, R., LANDÍN, M. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral beta-lapachone by solvent change precipitation of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69, n.3, p.871-877, 2008.

DAMIEN, G. Development of a solid dosage form compatibility studies on the active substance-excipients. **STP Pharma Pratiques**, v.14, n.3, p.303-310, 2004.

DANTAS, J. O.; CARVALHO, C. M.; VILAR, J. C. Chaves para identificação de vetores das principais zoonoses de Sergipe. II. Hemiptera. Siphonaptera. Basomatophora. **Biologia Geral e Experimental**, v.6, n.2, p.49-63, 2006.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.12, p.1023-1035, 2004.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.1, p.13-22, 2007.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o Trypanosoma cruzi e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p.370-375, 2006.

DINIZ, L. D. F.; CALDAS, I. S.; GUEDES, P. M. D. M.; CREPALDE, G.; DE LANA, M.; CARNEIRO, C. M.; TALVANI, A.; URBINA, J. A.; BAHIA, M. T. Effects of Ravuconazole Treatment on Parasite Load and Immune Response in Dogs Experimentally Infected with Trypanosoma cruzi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.7, p.2979-2986, 2010.

DNDi. Drugs for Neglected Disease Initiative. Plataforma para Pesquisa Clínica em Chagas. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas/estrategia-da-dndi.html>. Acesso em 27 de outubro de 2010.

F. BRAS. IV. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed, Rio de Janeiro: Atheneu, 1988.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism**. Guideline from U.S. Department of Health and Human Service. Dezembro, 2004.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**. Guideline from U.S. Department of Health and Human Service. Agosto, 1997.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. Guideline from U.S. Department of Health and Human Service. Maio, 2001.

FEDERSEL, H. J. Facing chirality in the 21st century: Approaching the challenges in the pharmaceutical industry. **Chirality**, v.15, n.S1, p.S128-S142, 2003.

FEKETE, R.; ZELKÓ, R.; MARTON, S.; RÁCZ, I. Effect of the formulation parameters on the characteristics of pellets. **Drug Development and Industry Pharmacy**, v.24, p. 1073-1076, 1998.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p.755-759, 1987.

FIOCRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Doença de Chagas, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>>. Acesso em: 10 de maio de 2010.

FRANCISCO, A. F.; DE ABREU VIEIRA, P. M.; ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. L.; MARTINS, H. R.; SILVA, M.; VELOSO, V. M.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. *Trypanosoma cruzi*: Effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. **Experimental Parasitology**, v.120, n.4, p.314-319, 2008.

FUNGARO, D. A.; BRUNO, M. Remoção de azul de metileno de solução aquosa usando zeólitas sintetizadas com amostras de cinzas de carvão diferentes. **Química Nova**, v.32, n.4, 2009.

GANDHI, R.; PILLAI, O.; THILAGAVATHI. R.; GOPALAKRISHNAN, B.; KAUL, C. L.; PANCHAGNULA, R. Characterization of azithromycin hydrates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.16, p.175-84, 2002.

GARCIA, E. S.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Biological factors involving *trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, suppl. 1, p. 213-216, 1999.

GELDART, D.; ABDULLAH, E. C.; HASSANPOUR, A.; NWOKE, L. C.; WOUTERS, I. Characterization of powder flowability using measurement of angle of repose. **China Particuology**, v.4, n.3-4, p.104-107, 2006.

GOHEL, M. C.; PATEL, L. D. Processing of Nimesulide-PEG 400-PG-PVP Solid Dispersions: Preparation, Characterization, and In Vitro Dissolution. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.29, n.3, p.299-310, 2003.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENA, S. D. J.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E. Trypanosoma cruzi: Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection in Human Blood. **Experimental Parasitology**, v.88, n.1, p.28-33, 1998.

GOVINDARAJAN, R.; NAGARSENKER, M. S. Influence of preparation methodology on solid-state properties of an acidic drug-cyclodextrin system. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, n.6, p.725-733, 2004.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of research of the National Bureau of Standards. Section A. Physics and Chemistry**. 81A, p.89-96, 1977.

GU, C. H.; LI, H.; GANDHI, R. B.; RAGHAVANA, K. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening. **International Journal of Pharmaceutics**, v.283, p.117-125, 2004.

GU, C. H.; YOUNG JR., V.; GRANT, D. J. W. Polymorph Screening: Influence of Solvents on the Rate of Solvent-Mediated Polymorphic Transformation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 11, p.1878-1890, 2001.

GUEDES, P. M. D. M.; URBINA, J. A.; DE LANA, M.; AFONSO, L. C. C.; VELOSO, V. M.; TAFURI, W. L.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T. Activity of the New Triazole Derivative Albaconazole against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in Dog Hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.11, p.4286-4292, 2004.

GUEDES, P. M. M. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.130, p.43-52, 2009.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**, v.357, n.10, p.1018-1027, 2007.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **ICH Topic Q 6 A: Test Procedures and acceptance criteria for New Drug Substances and New Drugs products: Chemical Substances**. Maio, 2000.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Novembro, 1996.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRSTION OF PHARMACEUTICAL FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Rockville, 2005. (ICH Harmonised Tripartite Guideline). Disponível em <[www.ich.org/lob/media417.pdf](http://www.ich.org/lob/media417.pdf)>.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, Revisão 03, 2010.

IUPAC. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Harmonized guidelines for single - laboratory validation of methods of analysis - IUPAC Technical Report, **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.5, p.835-855, 2002.

JACKSON, K.; YOUNG, D.; PANT, S. Drug-excipient interaction and their affect on absorption. **Research Focus**, v.3, n. 10, p. 336-45, 2000.

JOSHI, H. N. Drug development and imperfect design. **International Journal of Pharmaceutics**, v.343, n.1-2, p.1-3. 2007.

KASIM, A. N.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmacology**, v.1, n.1, p.85-96, 2004.

KETTANEH-WOLD, N. Use of experimental design in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.9, n.8, p.605-610, 1991.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.27, n. 1, p.48-49, 1975.

KISS, D.; ZELKO, R.; NOVAK, C. S.; EHEN, Z. S. Application of DSC and NIRS to study the compatibility of metronidazole with different pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, p.447-451, 2006.

LAMAS, M.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMON, C. J. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocidal drug benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v.307, n.2, p.239-243, 2006.

LANA, M.; TAFURI, W. L. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap.11, p.85-108.

LEITE, V. Lafepe fará medicamento antichagas. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 10 set. 2007. Disponível em: <<http://indexet.investimentosenoticias.com.br/arquivo/2007/09/10/128/Lafepe-fara-medicamento-antiChagas.html>>. Acesso em 27 de fevereiro de 2010.

LEONARDI, D.; SALOMÓN, C. J.; LAMAS, M. C.; OLIVIERI, A. C.. Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. **International Journal of Pharmaceutics**, v.367, n.1-2, p.140-147, 2009.

LIMA, Á. A. N. D.; SOARES SOBRINHO, J. L.; SILVA, J. L. D.; CORRÊA JÚNIOR, R. A. C.; LYRA, M. A. M.; ROLIM NETO, P. J. Development of dissolution method for benznidazole tablets. **Química Nova**, v.32, p.2196-2199. 2009.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, n.11, p.1607-1621, 2010.



LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, p.1-11, 2007.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. 2002. Disponível em: <[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM4\\_05/S1462399402004118sup002.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM4_05/S1462399402004118sup002.htm)>. Acesso em 10 de março de 2010.

MACHATHA, S. G.; YALKOWSKY, S. H. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP<sup>®</sup>, ACDlogP and KowWin<sup>®</sup> to experimentally determined values. **International Journal of Pharmaceutics**, v.294, n.1-2, p.185-192. 2005.

MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J. D.; CUNHA-FILHO, M. S. S. D. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v.33, p.1714-1719.

MISRA, M.; MISRA, A. K.; PANPALIA, G. M. Interaction study between pefloxacin mesilate and some diluents using DSC supported with isothermal method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.89, p. 803-808, 2007.

MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J. A. Activities of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) against Drug-Resistant Strains of the Protozoan Parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.1, p.150-155, 2000.

MORA, P. C.; CIRRI, M.; MURA, P. Differential scanning calorimetry as a screening technique in compatibility studies of DHEA extended release formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.42, p.3-10, 2006.

MORILLA, M. J.; MONTANARI, J. A.; PRIETO, M. J.; LOPEZ, M. O.; PETRAY, P. B.; ROMERO, E. L. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, n.2, p.311-318, 2004.

MURA, P.; GRATTEI, P.; FAUCCI, M. T. Compatibility studies of multicomponent tablet formulations, DSC and experimental mixture design. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 541-551, 2002.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653-655, 2009.

NUNES, R. S.; SEMAAN, F. S.; RIGA, A. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Thermal behavior of verapamil hydrochloride and its association with excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2009.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 123. Partition coefficient n-octanol/water Slow-stirring method for highly hydrophobic chemicals. Novembro, 2003.

OPS. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Tratamiento etiológico de La enfermedad de Chagas: Conclusiones de uma consulta técnica. 32p., 1998.

ÖZER A. Y.; CAKOGLU O.; TAYLAN B.; MAZDA F.; SUMMU M. Evaluation of the stability of commercial effervescent ascorbic acid tablets by factorial design. **STP Pharma Science**, v.3, p.313-317, 1993.

PÉCOUL, B. New Drugs for Neglected Diseases: From Pipeline to Patients. **PLoS Med**, v.1, n.1, p.e6, 2004.

PEREIRA, A. D. S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; DE NUCCI, G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.28, p.S107-S111, 2005.

PRESCOTT, J. K.; BARNUM, R. A. On powder flowability. **Pharmaceutical Technology**, p. 60-84, 2000.

RASENACK, N.; HARTENHAUER, H.; MÜLLER, B. W. Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.254, p.137-145, 2003.

RASENACK, N.; MÜLLER, B. W. Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. **Pharmaceutics Research**, v.19, n.12, p.1894-1900, 2002.

RASENACK, N.; STECKEL, H.; MÜLLER, B. W. Preparation of microcrystals by in situ micronization. **Powder Technology**, v.143-144, p.291-296, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RFE. **Real Farmacopea Española**. 3 ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROGERS, T. L. A novel particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: spray-freezing into liquid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p.271-280, 2002.

ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L. D.; SOEIRO, M. D. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S. G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. D. A. J. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.233-238, 2010.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6 ed. Pharmaceutical Press, 917p., 2009.

- SÁ-BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Latin American Journal Pharmacy**, v.27, n.4, p.1-8, 2008.
- SÁ-BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Excipientes Co-processados para Compressão Direta de Comprimidos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.2, p. 304-312, 2009.
- SANTOS, F. R.; PENA, S. D.; EPPLIN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetics**, v.90, p.655-656, 1993.
- SARKARI, M.; BROWN, J.; CHEN, X.; SWINNEA, S.; WILLIAMS, R. O.; JOHNSTON K. P. Enhanced drug dissolution using evaporative precipitation into aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, p. 17-31, 2002.
- SCHMUNIS, G. A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, suppl 1, p.93-101, 1999.
- SCHÜSSELE, A.; BAUER-BRANDL, A. Note on the measurement of flowability according to the European Pharmacopoeia. **International Journal of Pharmaceutics**, v.257, n.1-2, p.301-304, 2003.
- SHAH, J. C. et al. Preformulation study of etoposide: Increased solubility and dissolution rate by solid-solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.113, p.103-111, 1995.
- SHEKUNOV, B.Y.; YORK, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of Crystal Growth**, v.211, p. 122-136, 2000.
- SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R. S.; LIMA, F. C. A.; SILVA, A. B. F.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Complexation of the anti-*Trypanosoma cruzi* Drug Benznidazole Improves Solubility and Efficacy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.4104-4114, 2008.
- SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.335-347, 2004.
- SOARES-SOBRINHO, J. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; ROLIM NETO, P. J.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; DACUNHA-MARINHO, B. Benznidazole. **Acta Crystallographica**, E64, o634, E. 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**, v. 87, n. 3, p.78-80, 2006.
- SOEIRO, M. N.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.13, p.105-121, 2009.
- SOARES, L. A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; SCHMIDT, P. C. Dry Granulation and Compression of Spray-Dried Plant Extracts. **AAPS PharmSciTech**. v.6, n.3, E359-E366, 2005.

SOUZA, W. Structural organization of *trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p.89-100, 2009.

STANIFORTH, J. N. Fluxo de pós. In: AULTON, M. E., Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.208-221.

STANLEY-WOOD, N. G. **Enlargement and compaction of particulate solids**. 1ed. London: Butterworths, 1983.

STECKEL, H.; RASENACK, N.; MÜLLER, B. W. In-situ-micronization of disodium cromoglycate for pulmonary delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.55, n.2, p.173-180, 2003a.

STECKEL, H.; RASENACK, N.; VILLAX, P.; MÜLLER, B. W. In vitro characterization of jet-milled and in-situ-micronized fluticasone-17-propionate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.258, p.65-75, 2003.

STULZER, H. K.; RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. M.; MATOS, J. S. R.; SILVA, M. A. S. Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, p. 323-328, 2008.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; CRUZ, A. P. Compatibility studies between piroxicam and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, p. 215-219, 2008a.

SWAMIVELMANICKAM, M.; VALLIAPPAN, K.; REDDY, P. G.; MADHUKAR, A.; MANAVALAN, R.; Preformulation studies for Amoxicillin trihydrate and Dicloxacillin sodium as Mouth Dissolve tablets. **International Journal of Chem Tech Research**, v.1, n.4, p. 1032-1035, 2009.

SZEJTLI, J. Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research. **Pure and Applied Chemistry**, v.76, n.10, 2004.

TEIXEIRA, A. R. L.; GOMES, C.; LOZZI S. P.; HECHT M. M.; ROSA A. C.; MONTEIRO, P. S. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. **Cadernos Saúde Pública**, v.25, suppl.1, p.S32-S44, 2009.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. [IUPAC] International Union of Pure And Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THRELFALL, T. L. Crystallization of polymorphs: thermodynamic insight into the role of the solvent. **Organic Process Research & Development**, v. 4, p.384-390, 2000.

TOLEDO, M. J. D. O.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TIBAYRENC, M.; BARNABE, C.; TAFURI, W. L.; DE LANA, M. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for Mice Infected with Different *Trypanosoma cruzi* Clonal Genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.1, p.223-230. 2003.

TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, M.-C.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection,

pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, n.2, p.201-209, 2004.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v.359, p.2188-2194, 2002.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v.115, n.1-2, p.55-68, 2009.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, p.495-501, 2003.

USP30. UNITED STATES PHARMACOPEIA, 30 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VARSHOSAZ, J.; TALARI, R.; MOSTAFAVI, S. A.; NOKHODCHI, A. Dissolution enhancement of gliclazide using in situ micronization by solvent change method. **Powder Technology**, 2008.

VENTURINI, C. D. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v.31, n.2, p.360-368, 2008.

VILA JATO, J. **Tecnología Farmacéutica**, 1 ed. Madrid: Síntesis, 1997.

WANG, J.; URBAN, L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. **Drug Discovery World Fall**, p.73-86, 2004.

WANG, X.; PONDER, C. S.; KIRWAN, D. J. Low molecular weight poly(ethylene glycol) as an environmentally benign solvent for pharmaceutical crystallization and precipitation. **Crystal Growth & Design**, v.5, p. 85-92, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. **Technical Report Series**, n. 905, p.1-109, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. **The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)**, Argentina, 104p., 2007.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.73, n.1, p.102-106, 2009.

---

## ANEXOS

### Artigos publicados

MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J. D.; CUNHA-FILHO, M. S. S. D. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v.33, p.1714-1719.

MAXIMIANO, F.; NOVACK, K.; BAHIA, M.; DE SÁ-BARRETO, L.; DA CUNHA-FILHO, M. Polymorphic screen and drug–excipient compatibility studies of the antichagasic benznidazole. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p.1-6. doi:10.1007/s10973-011-1371-6.

MAXIMIANO, F. P.; DE PAULA, L. M.; FIGUEIREDO, V. P.; DE ANDRADE, I. M.; TALVANI, A.; SÁ-BARRETO, L. C.; BAHIA, M. T.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.In Press, Uncorrected Proof. doi:10.1016/j.ejpb.2011.03.003.

### Artigo aceito para publicação

MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SÁ-BARRETO, L. C.; BAHIA, M. T.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Development of effervescent tablets containing benznidazole complexed with cyclodextrin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**.

### Resumos publicados em anais de congressos

PAULA, L. M.; COSTA, G.H.Y.; MAXIMIANO, F. P.; CUNHA FILHO, M. S. S. Melhoria do perfil de dissolução do fármaco antichagásico Benznidazol através da utilização de micropartículas. In: XVII Seminário de Iniciação científica da UFOP, 2009, Ouro Preto. **Anais do XVII Seminário de Iniciação científica da UFOP**. Ouro Preto: UFOP, 2009.

COSTA, G.H.Y.; MAXIMIANO, F. P.; CUNHA FILHO, M. S. S. Determinação do coeficiente de partição do fármaco antichagásico benznidazol empregando método de agitação moderada. In: XVII Seminário de Iniciação científica da UFOP, 2009, Ouro Preto. **Anais do XVII Seminário de Iniciação científica da UFOP**. Ouro Preto: UFOP, 2009.

MAXIMIANO, F. P.; PAULA, L. M.; CUNHA FILHO, M. S. S. Utilidade de diferentes polímeros na estabilização de micropartículas de Benznidazol. In: II Congresso Internacional de Medicamentos, 2009, Brasília. **Anais do II Congresso Internacional de Medicamentos**. Brasília: IDUM, 2009.

COSTA, G.H.Y.; MAXIMIANO, F. P.; CUNHA FILHO, M. S. S. Determinação da solubilidade e do coeficiente de partição do fármaco antichagásico Benznidazol. In: II

Congresso Internacional de Medicamentos, 2009, Brasília. **Anais do II Congresso Internacional de Medicamentos**. Brasília: IDUM, 2009.

COSTA, G.H.Y. ; MAXIMIANO, F. P.; CUNHA FILHO, M. S. S. Parâmetros para classificação biofarmacêutica: discussão sobre cálculos e variáveis utilizando Benznidazol como modelo. In: II Congresso Internacional de Medicamentos, 2009, Brasília. **Anais do II Congresso Internacional de Medicamentos**. Brasília: IDUM, 2009.

MAXIMIANO, F. P.; NOVACK, K. M.; CUNHA FILHO, M. S. S. Screening polimórfico do fármaco antichagásico benznidazol. In: VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, 2010, São Pedro. **Anais do VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**. São Pedro: ABRATEC, 2010.

MAXIMIANO, F. P.; NOVACK, K. M.; CUNHA FILHO, M. S. S. Compatibilidade térmica do antichagásico benznidazol com diferentes excipientes farmacêuticos. In: VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, 2010, São Pedro. **Anais do VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**. São Pedro: ABRATEC, 2010.