

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE HIDROXIMETILNITROFUZONA E HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA

Renato Grillo, Nathalie F. S. de Melo e Leonardo Fernandes Fraceto\*

Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Sorocaba, Av. Três de Março, 511, 18087-180 Sorocaba – SP, Brasil

Charles L. Brito, Gustavo H. G. Trossini, Carla M. S. Menezes e Elizabeth Igne Ferreira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo – SP, Brasil

Carolina Moraes Moraes

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 13/2/07; aceito em 13/7/07; publicado na web em 19/12/07

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF INCLUSION COMPLEX BETWEEN HYDROXYMETHYLNITROFUZONA AND HYDROXYPROPYL- $\beta$ -CYCLODEXTRIN. Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) is a prodrug that is active against *Trypanosoma cruzi*. It however presents low solubility and high toxicity. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) can be used as a drug-delivery system for NFOH modifying its physico-chemical properties. The aim of this work is to characterize the inclusion complex between NFOH and HP- $\beta$ -CD. The rate of NFOH release decreases after complexation and thermodynamic parameters from the solubility isotherm studies revealed that a stable complex is formed ( $\Delta G^\circ = -1.7$  kJ/mol). This study focuses on the physico-chemical characterization of a drug-delivery formulation that comes out as a potentially new therapeutic option for Chagas disease treatment.

Keywords: hydroxymethylnitrofurazone; cyclodextrin; inclusion complex.

### INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana, também denominada doença de Chagas, é uma parasitose tecidual e hematológica causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A transmissão ao homem e a vários mamíferos ocorre por insetos pertencentes à subfamília *Triatoma*, que se caracterizam por picar a face das pessoas e são popularmente conhecidos como “barbeiros”<sup>1</sup>.

A doença de Chagas apresenta-se em fases clínicas distintas. A fase aguda (inicial) leva, na ausência de tratamento específico, ao surgimento de sintomas característicos como febre e inchaço dos gânglios linfáticos, os quais persistem por cerca de dois meses. Esta fase pode ser fatal, 2 a 8% de óbito, em especial em crianças. Em seguida, a doença evolui à fase indeterminada ou à fase crônica. Na fase indeterminada, o indivíduo é portador do parasito, porém a doença é assintomática. Entretanto, cerca de 20 a 50% dos casos agudos evoluem à fase denominada crônica, caracterizada por baixa parasitemia e ausência do estado febril. A evolução da doença acarreta o comprometimento progressivo de órgãos, com destaque às formas cardíacas, seguidas por manifestações digestivas, através do desenvolvimento do megaesôfago e megacôlon<sup>2,3</sup>. Em consequência de a evolução clínica coincidir com a fase economicamente produtiva (20 a 50 anos), a morbi-mortalidade manifestada é propriedade comum à doença e constitui-se em sério problema médico-social, agravado que é por sua incidência em países em desenvolvimento<sup>4</sup>.

Compostos nitro-heterocíclicos constituem a principal classe dos fármacos empregados para o tratamento da tripanossomíase americana. Dois destes compostos representam as únicas opções terapêuticas na atualidade, nifurtimox e benznidazol. Entretanto, estudos diversos têm mostrado que a resposta a estes fármacos é dependente de uma série de fatores como a região geográfica, a idade do pacien-

te, o período e dose utilizados e, em especial, da fase de desenvolvimento da doença. Estes fármacos apresentam efeito considerável na fase aguda e em infecções crônicas recentes. Contudo, são pouco eficazes na fase crônica, mais avançada, da doença. Em adição, nifurtimox e benznidazol apresentam graves efeitos adversos em nível de sistema nervoso central e imunológico, os quais desaparecem com a interrupção ou a diminuição da dose administrada<sup>5,6</sup>.

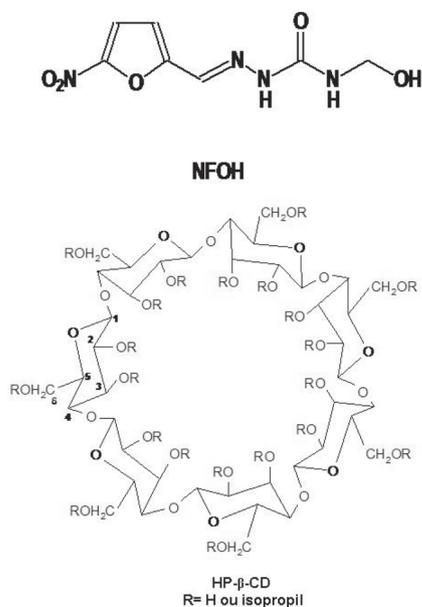
O Nitrofurazol (5-nitro-2-furaldeído semicarbazona) é um fármaco que primariamente foi observada atividade contra microorganismos Gram-positivos, sendo utilizado em infecções tóxicas. Posteriormente, Gonçalves e colaboradores<sup>7</sup> encontraram que o Nitrofurazol apresentava atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, causando a inibição da enzima tripanotona redutase, sendo esta enzima encontrada apenas no parasita, mas não no hospedeiro<sup>7</sup>.

Neste contexto, pró-fármacos duplos de nitrofurazol e primaquina, com espaçantes peptídicos, foram planejados de forma a apresentar ação seletiva contra a enzima parasitária tripanotona redutase<sup>8</sup>. Ação tripanomicida *in vitro* foi observada, inclusive para o intermediário de síntese, o hidroximetil derivado do nitrofurazol (NFOH, Figura 1).

O NFOH mostrou-se mais ativo que o benznidazol e seu protótipo, o nitrofurazol, sendo, ainda, cerca de quatro vezes menos mutagênico que este<sup>9</sup>. Tais propriedades foram, preliminarmente, associadas à introdução do grupo hidroximetil, o que proporcionou aumento de hidrossolubilidade ao composto e diminuição do ponto de fusão<sup>10</sup>. Entretanto, embora tenha sido observado aumento de solubilidade em água de 0,657 mg/mL, no caso do NF, para 0,992 mg/mL, em se tratando do NFOH, este último apresenta, ainda, reduzida hidrossolubilidade.

Fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos<sup>11</sup>. Dentre as técnicas empregadas para aumentar a dissolução e diminuição de toxicidade, destaca-se o emprego da complexação de fármacos com ciclodextrinas<sup>12,13</sup>.

\*e-mail: leonardo@sorocaba.unesp.br



**Figura 1.** Estrutura química da hidroximetilnitrofurazona e representação esquemática da estrutura da HP-β-CD apresentando sete monômeros de glicose

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e alteram a intensidade e a duração dos efeitos dos fármacos<sup>14</sup>. As  $\beta$ -CDs são carreadores, levando a molécula hidrofóbica em solução, mantendo-a dissolvida e transportando-a à membrana celular lipofílica<sup>15</sup>.

Na literatura não existem estudos da interação de compostos nitroeterocíclicos com ciclodextrinas; desta forma, este trabalho visou o preparo e caracterização do complexo de inclusão entre NFOH e 2-Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina – HP- $\beta$ -CD (uma ciclodextrina modificada como propriedades menos tóxicas e maior solubilidade que a  $\beta$ -ciclodextrina<sup>12,13</sup>), utilizando para caracterização físico-química, métodos espectrofotométrico e testes de liberação *in vitro*, a fim de comparar os efeitos da complexação nas propriedades físico-químicas deste composto.

Este trabalho de caracterização do complexo se mostra importante para estudos futuros *in vitro* e *in vivo*, de forma a gerar uma potencial alternativa para o tratamento da doença de Chagas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais e métodos

O NFOH foi sintetizado no LAPEN-FCF- Universidade de São Paulo. A HP- $\beta$ -CD foi obtida por doação da indústria farmacêutica Roquette. Todos os demais reagentes, como sais e solventes, utilizados apresentavam grau espectroscópico/analítico.

### Cinética de complexação

Para a avaliação da cinética de formação dos complexos, misturou-se quantidades 1:1 (razão molar) de NFOH (35  $\mu$ M) e HP- $\beta$ -CD em água e submeteu-se à agitação, a 25 °C. Posteriormente, alíquotas foram retiradas e analisadas por espectrofotometria no comprimento máximo de 375 nm (NFOH) até que a absorbância estabilizasse em solução (medidas realizadas nos tempos de: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 18; 20; 22; 24; 42; 44; 46; 48; 67; 71; 92; 94; 162; 164; 209; 211; 235 e 237 h). Foi observado também o comportamento da absorbância de uma solução de mesma concen-

tração do NFOH (35  $\mu$ M) como referência. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A análise dos dados cinéticos foi realizada usando o software Sigma Plot® versão 8.0 a partir do melhor ajuste obtido através da exponencial simples descrita na Equação 1.

$$A = A_0 + a \cdot (1 - e^{-\frac{t}{k}}) \quad (1)$$

onde A representa a absorbância normalizada, t o tempo em horas, a é coeficiente da equação e k a constante cinética.

### Preparo de complexos de inclusão por co-solubilização

O complexo de inclusão entre NFOH e HP- $\beta$ -CD foi preparado pelo procedimento descrito na literatura<sup>16</sup>, no qual, uma solução contendo NFOH foi preparada utilizando acetona como solvente (devido ao fármaco apresentar uma melhor solubilidade) e uma solução de HP- $\beta$ -CD preparada em água, ambas em mesmas quantidades molares. Estas soluções foram deixadas sob agitação até completa solubilização das substâncias, sendo em seguida misturadas e deixadas sob agitação. Após completa solubilização, a solução final foi levada ao evaporador rotativo para evaporação dos solventes, sendo o sólido resultante solubilizado em água. Esta solução contendo o complexo foi liofilizada e armazenada em dessecador com sílica para posterior utilização.

### Isotermas de solubilidade

Os estudos de solubilidade foram realizados de acordo com o método descrito na literatura<sup>17</sup>. Adicionou-se excesso de NFOH em água e acrescentou-se quantidades crescentes de HP- $\beta$ -CD (0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 mM) a soluções contendo o fármaco.

As soluções foram submetidas à agitação até atingir o equilíbrio (100 h) sendo centrifugadas por 15 min à 280 g, para retirada do excesso de NFOH não solubilizado. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e filtradas em membranas de 0,22  $\mu$ m, medindo-se a absorbância ( $\lambda=375$  nm) correspondente à concentração de NFOH solubilizado.

Foi utilizada para análise quantitativa do NFOH a curva de calibração determinada espectrofotometricamente (Absorbância = 14,10[NFOH] + 0,0555, r= 0,9998). Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de NFOH, utilizando-se a constante de absorvidade molar obtida pela curva de calibração. Os experimentos foram realizados em triplicata em diferentes temperaturas (12-35 °C).

A partir dos dados, obtiveram-se isotermas de solubilidade (concentração de NFOH vs concentração de HP- $\beta$ -CD) e mediu-se a constante de afinidade (K) utilizando a Equação 2<sup>17</sup>.

$$K = \frac{\text{inclinação}}{S_0 \cdot (1 - \text{inclinação})} \quad (2)$$

onde  $S_0$  é a concentração para saturação do fármaco em solução.

### Relações termodinâmicas

$\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  representam, respectivamente, a entalpia e entropia padrão do NFOH envolvida no processo de complexação com a cavidade da HP- $\beta$ -CD. Estas energias podem ser calculadas usando a relação termodinâmica de van't Hoff apresentada na Equação 3<sup>18-20</sup>.

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

onde T é a temperatura (em Kelvin), R a constante dos gases, K a

constante de afinidade.

Para a relação linear de van't Hoff ( $\ln K$  vs  $1/T$ ) a inclinação e o intercepto representam, respectivamente,  $-\Delta H^\circ/R$  e  $\Delta S^\circ/R$ .

### Testes de liberação *in vitro*

Nos testes de liberação foram utilizados sistemas de dois compartimentos, separados por membranas de celulose (Spectrapore) de poro para exclusão molecular de 1000 Da, que permitiram observar a liberação do NFOH livre e complexado, desde o compartimento doador (1 mL) até o compartimento receptor (80 mL), contendo tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 sob agitação leve<sup>21</sup>. Amostras do compartimento receptor foram coletadas, durante 7 h, e a concentração de NFOH foi determinada por espectrofotometria UV ( $\lambda=375$  nm). A liberação modificada foi observada através do gráfico de %NFOH liberado em função do tempo. Os experimentos foram realizados em triplicata. A quantificação da porcentagem de NFOH liberado foi realizada utilizando a curva de calibração descrita acima.

A modelagem matemática dos dados (Sigma Plot ® 8. 0) foi usada para analisar os perfis de liberação do NFOH em presença e ausência de ciclodextrina. Foram utilizados os modelos monoexponencial (Equação 4) e biexponencial (Equação 5). A seleção do modelo foi baseada no melhor valor de coeficiente de correlação do ajuste da curva experimental para cada um dos dados.

$$C = a.(1 - e^{-\frac{t}{k}}) \quad (4)$$

$$C = a.(1 - e^{-\frac{t}{k_1}}) + b.(1 - e^{-\frac{t}{k_2}}) \quad (5)$$

onde  $C$  é a concentração (% de fármaco liberado),  $t$  o tempo e  $k$ ,  $k_1$  e  $k_2$  são as constantes cinéticas.

### Análise da estabilidade do NFOH

A análise da estabilidade química do NFOH foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o equipamento Shimadzu com sistema controlador (Shimadzu SCL - 10VP), bombas A e B (Shimadzu LC - 10AD VP), degaseificador (Shimadzu DGU - 14A), detector UV-VIS (SPD - 10A VP), auto-injetor (Shimadzu SIL - 10AD VP), forno (Shimadzu CTO - 10AS). Os cromatogramas foram determinados através do programa Class - VP 6. 12.

Foram utilizadas as seguintes condições analíticas: coluna Phenomenex, Gemini,  $C_{18}$  fase reversa,  $5 \mu$  110 Å, 250 x 4,60 mm; fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ , volume injetado da amostra de  $20 \mu\text{L}$ , comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 210 nm, temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e fase móvel: acetonitrila/água (80/20) (v/v). Os cromatogramas foram analisados utilizando o software Class VP 6. 12. Foram analisadas amostras ( $40 \mu\text{M}$ ) de NFOH, NFOH:HP- $\beta$ -CD, Nitrofural deixadas sob agitação por um período de 100 h.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cinética de complexação

As ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão, alterando a intensidade e duração dos efeitos de fármacos complexados<sup>14,22</sup>.

Após inclusão na cavidade das ciclodextrinas, a molécula complexada sofre mudanças em suas características físico-químicas, fornecendo meios para se detectar o fenômeno da complexação. Em solução, há um equilíbrio entre as moléculas complexadas; se ocorrer complexação há uma alteração no espectro de absorção

UV/VIS (deslocamentos ou aumento/diminuição do pico de absorção máximo) que, muitas vezes, são similares aos efeitos causados por solventes com diferentes polaridades. Isso sugere que a molécula "convidada" está sendo transferida de um meio polar para a cavidade apolar das ciclodextrinas<sup>21</sup>.

Essas mudanças podem ser devidas a perturbações eletrônicas na molécula complexada causadas pela interação direta com as CD, pela exclusão de moléculas de água da cavidade ou por uma combinação desses dois efeitos. Embora seja difícil a detecção dessas alterações espectrais (quando observadas no UV), este método ainda é bastante utilizado<sup>23,24</sup>.

Durante o preparo do complexo, determinou-se a cinética de complexação para NFOH e HP- $\beta$ -CD, acompanhando o pico de absorção do NFOH, no comprimento de onda de 375 nm, em função do tempo até se encontrar o equilíbrio em solução, utilizando-se a técnica de espectrofotometria (UV-visível).

A curva de cinética de complexação obtida pode ser observada na Figura 2; nesta curva, o valor de absorbância foi normalizado (Absorbância normalizada = Absorbância tempo  $t$ /Absorbância tempo zero). O comportamento do NFOH em solução foi acompanhado em função do tempo para verificar se a variação observada na absorbância é devida à complexação ou se é apenas um efeito do fármaco em função do tempo.

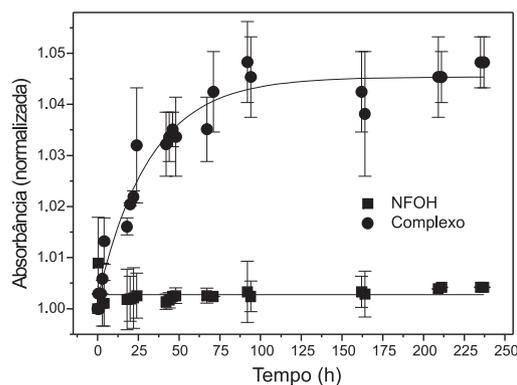


Figura 2. Curvas de cinética de complexação do NFOH e HP- $\beta$ -CD, razão molar 1:1,  $20^\circ\text{C}$ , pH 7,0 ( $n=3$ )

A partir dos dados da Figura 2, observa-se que com o decorrer do tempo as variações na absorbância do NFOH foram muito menores quando comparadas com os valores obtidos para o complexo NFOH:HP- $\beta$ -CD. Este dado indica que quando o fármaco se encontra em presença de CDs ocorrem perturbações eletrônicas na molécula do NFOH complexado, causadas pela interação direta com a cavidade da ciclodextrina, pela exclusão de moléculas de água da cavidade ou por uma combinação desses dois efeitos<sup>23,24</sup>. Observa-se ainda que para o complexo NFOH:HP- $\beta$ -CD o sistema atingiu o equilíbrio visto, que houve uma estabilização da absorbância do fármaco.

A análise da curva cinética do NFOH em presença de HP- $\beta$ -CD foi realizada utilizando o software Sigma Plot ® versão 8. 0. O melhor ajuste para a curva foi obtido com o modelo matemático de uma de uma monoexponencial (Equação 1, coeficiente de correlação 0,988). A cinética de complexação do composto NFOH com HP- $\beta$ -CD apresentou-se de primeira ordem (ajuste monoexponencial), ou seja, a complexação depende principalmente da concentração de uma das espécies, sendo o valor da constante cinética obtido para o complexo de  $32,05 \pm 3,20$  h.

No entanto, cabe ressaltar que as variações de absorbância encontradas neste experimento são baixas, o que faz com que os valores de desvios experimentais sejam grandes e, por conseqüência, que o perfil do complexo apresente pontos fora da curva para o melhor ajuste realizado.

### Isotermas de solubilidade

Sabe-se que a formação de complexos de inclusão com CDs pode exercer alguns efeitos sobre a molécula complexada, como melhorar a solubilidade, acelerar ou retardar a absorção e estabilizar o fármaco em solução<sup>12,13</sup>. Porém, todos esses efeitos são dependentes da estabilidade e da solubilidade do complexo formado. Essas duas propriedades são independentes, pois um complexo muito estável pode ser muito solúvel e, portanto, difícil de ser obtido em sua forma cristalina. Por outro lado, um complexo de baixa solubilidade pode ter também uma baixa estabilidade e ser facilmente isolado. Existe uma correlação direta entre a estabilidade do complexo e o melhoramento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água. O estado de equilíbrio de um sistema formado pela CD e a molécula “convidada” (MC) com estequiometria de 1:1 pode ser dado pela equação da constante de associação, estabilidade ou formação do complexo (K) (Equação 2)<sup>25,26</sup>.

A constante de afinidade do complexo é dependente da temperatura (o valor de K tende a diminuir rapidamente com o aumento da temperatura) devido à dissociação do complexo<sup>27</sup>.

Dentre os métodos utilizados para determinação do valor de K estão as isotermas de solubilidade, onde a molécula “convidada”, ao encontrar-se em um sistema composto por CD e água, pode mudar sua solubilidade. Esta mudança pode ser representada por um aumento até certo limite ou até mesmo uma diminuição da solubilidade inicial<sup>26</sup>.

Sendo assim, a partir de experimentos de solubilidade de fases, foi possível acompanhar as mudanças nas propriedades físico-químicas do potencial protótipo de fármaco antichagásico em estudo em HP- $\beta$ -CD em função da temperatura.

As isotermas de solubilidade para o NFOH em presença de HP- $\beta$ -CD (Figura 3) mostram comportamentos distintos nas diversas temperaturas (12 a 35 °C).

Na faixa de temperatura entre 12 e 20 °C (Figura 3a) observa-se um aumento linear na solubilidade do composto antichagásico em função das concentrações crescentes de ciclodextrina, sugerindo que os complexos formados são de primeira ordem (considerando-se uma estequiometria de complexação 1:1)<sup>26</sup>. Nestes experimentos, o composto NFOH foi adicionado ao meio em uma concentração acima da solubilidade; desta forma, o aumento da concentração destes no sobrenadante deve-se à formação de complexos de inclusão solúveis com a molécula de ciclodextrina.

No entanto, acima de 20 °C, os diagramas de solubilidade do NFOH apresentaram uma modificação no seu perfil. Deixaram de ser do Tipo A e passam a ser do Tipo B, ou seja, o complexo formado deixa de ser solúvel passando para parcialmente solúvel a 25 °C e insolúvel em 30 e 35 °C (Figura 3b).

Os valores de K foram calculados para as curvas da Figura 3a, utilizando-se apenas a parte linear das curvas e os dados do ajuste linear destas curvas foram inseridos na Equação 2. Os valores de K obtidos para a interação entre NFOH e HP- $\beta$ -CD nas diferentes temperaturas estão apresentados na Tabela 1.

A Figura 4 apresenta a relação linear ( $r = 0,990$ ) entre  $\ln K$  vs  $1/T$  (van't Hoff). Os parâmetros termodinâmicos da complexação entre NFOH e HP- $\beta$ -CD foram calculados a partir do ajuste linear da Figura 4 e Equação 3.

Os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  determinados para a complexação são  $-133,63$  e  $-0,442$  kJ/mol/K, respectivamente, sendo o da energia livre de Gibbs calculado a partir destes valores, igual a  $-1,7$  kJ/mol, indicando uma complexação favorável.

Uma vez que a complexação é diminuída em função da temperatura isto indica que esta é dependente da entalpia, como relatado para muitos complexos de inclusão<sup>26</sup>. A formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas é atribuído normalmente a valores ne-

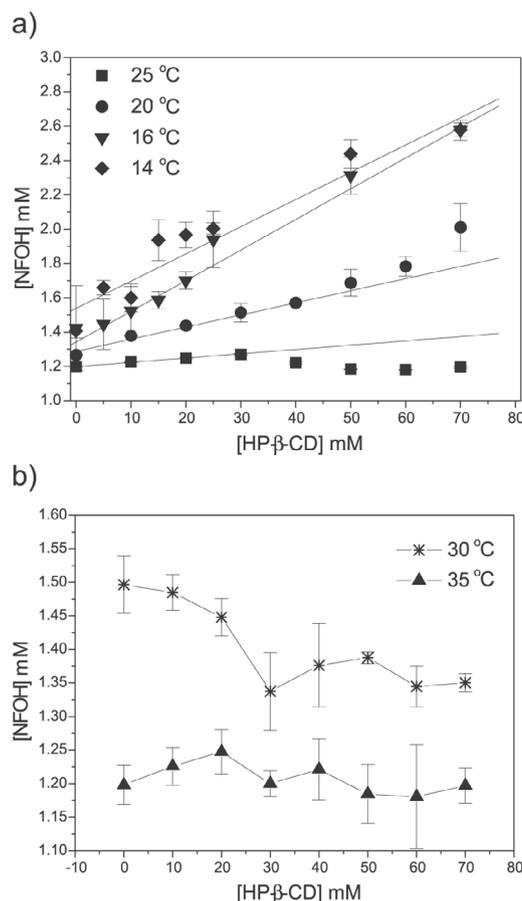


Figura 3. Diagrama de solubilidade de fases para o NFOH em presença de HP- $\beta$ -CD, a) 12 a 25 °C e b) 30-35 °C ( $n=3$ )

Tabela 1. Constantes de afinidade (K) para o complexo de inclusão NFOH:HP- $\beta$ -CD determinadas através das isotermas de solubilidade em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	K (M <sup>-1</sup> )
12	27,6 ± 2,3
14	13,5 ± 1,4
16	9,8 ± 0,9
20	5,5 ± 0,2
25	2,0 ± 0,3

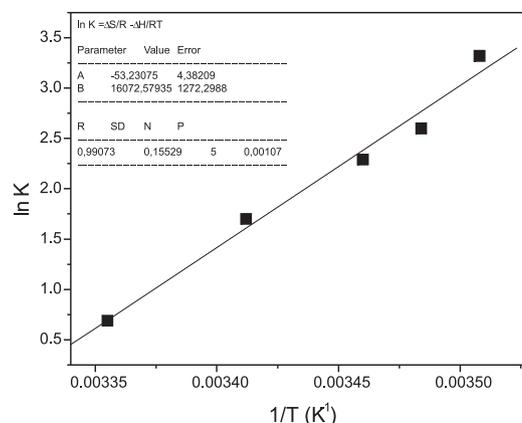


Figura 4. Relação van't Hoff ( $\ln K$  vs  $1/T$ ) para interação NFOH:HP- $\beta$ -CD determinada através das isotermas de solubilidade em diferentes temperaturas

gativos de  $\Delta H^\circ$ , indicando assim a existência de forte interação hidrofóbica, enquanto que os valores de  $\Delta S^\circ$  podem ser negativos ou ligeiramente positivos, indicando que a inclusão da molécula hóspede não acompanha uma dessolvatação muito forte, levando à formação de complexos que são governados primariamente por processos entálpicos<sup>28</sup>.

### Teste de liberação *in vitro*

Os sistemas de liberação devem modificar o perfil de concentração do fármaco ao longo do tempo, quando comparado ao fármaco<sup>29,30</sup>. Nesse sentido, os testes de liberação *in vitro* possibilitam avaliar a permeação de fármacos através de membranas.

O perfil de liberação do NFOH e do seu complexo de inclusão com HP- $\beta$ -CD está apresentado na Figura 5. Neste ensaio, o fármaco possui a capacidade de atravessar os poros da membrana, porém as moléculas de HP- $\beta$ -CD (Massa Molar 1480 Da) não a atravessam e, desta forma, é possível observar o efeito da complexação na velocidade de liberação do fármaco.

A Figura 5 apresenta as curvas de porcentagem de liberação para a molécula de NFOH em presença e ausência de HP- $\beta$ -CD em função do tempo (420 min, a 20 °C). Pela análise das curvas observa-se que a liberação total do NFOH (100%) em solução ocorreu após 200 min de diálise, em contraste com os resultados obtidos para o NFOH complexado, em que somente uma menor quantidade destes foram liberados no mesmo intervalo de tempo. A análise estatística da área sobre a curva dos dois conjuntos de dados foi realizada utilizando teste t não pareado (com correção de Welch) apresentando diferença significativa entre as curvas ( $p < 0,001$ ). Desta forma, a presença de HP- $\beta$ -CD no sistema retarda a liberação do composto NFOH, em comparação à solução controle.

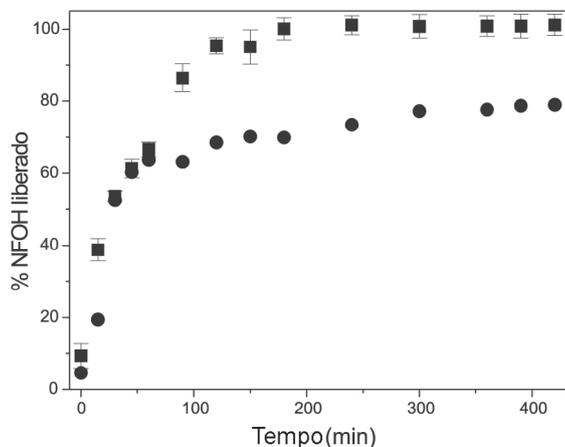


Figura 5. Teste de liberação *in vitro* para o NFOH livre e em presença de HP- $\beta$ -CD, 20 °C, pH 7,0 ( $n=3$ )

A modelagem matemática dos dados obtidos a partir das curvas cinéticas foi realizada sendo utilizados dois modelos matemáticos, um monoexponencial e outro biexponencial (Equações 4 e 5). Os resultados dos melhores ajustes mostram que: o comportamento de liberação para o NFOH é monoexponencial,  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) =  $44,24 \pm 3,52$  ( $r=0,989$ ), indicando assim que existe apenas uma constante de equilíbrio entre o compartimento interno e o externo (Figura 6a); o complexo apresenta um perfil de liberação biexponencial,  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) =  $25,77 \pm 7,90$  e  $k_2$  ( $\text{min}^{-1}$ ) =  $83,33 \pm 10,83$  ( $r=0,992$ ), indicando assim, a existência de dois equilíbrios dentro do compartimento doador do sistema de diálise. Neste caso, inicialmente o fármaco que se encontra livre da cavidade da ciclodextrina apresenta uma liberação rápida ( $k_1$ ) enquanto que aquele que está associado à cavidade da

ciclodextrina apresenta uma liberação mais lenta ( $k_2$ ) (Figura 6b).

A liberação menor do composto antichagásico (NFOH) frente à membrana de diálise é devida à existência do equilíbrio de complexação do fármaco com a cavidade interna das ciclodextrinas dentro do compartimento doador, uma vez que devido ao poro da membrana de diálise ser de 1000 Da de massa e a HP- $\beta$ -CD possuir massa média de 1480 Da, esta não atravessa a membrana, ficando ao longo do tempo constante no compartimento doador. Porém, com a liberação da molécula do fármaco em função do tempo através da membrana, a proporção de ciclodextrina/fármaco vai aumentando fazendo com que ocorra um deslocamento do equilíbrio em função da formação de complexo, o que faz com que a liberação seja mais lenta em função do tempo, ou seja, modificada<sup>31</sup> (Figura 6).

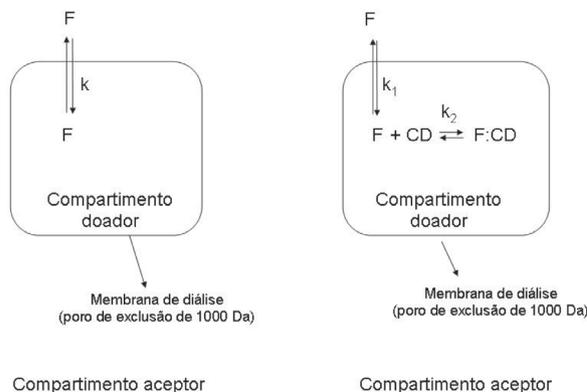


Figura 6. Representação esquemática dos possíveis equilíbrios de liberação existentes: a) NFOH e b) complexo NFOH:HP- $\beta$ -CD, onde F = NFOH e CD=HP- $\beta$ -CD

### Análise da estabilidade do NFOH

Uma vez que o NFOH é um derivado hidroximetilado do nitrofural este pode sofrer hidrólise em solução aquosa. Desta forma, a presença de produtos de hidrólise no meio (como o nitrofural - NF) pode influenciar na complexação observada nos experimentos, uma vez que a complexação pode ocorrer com estes produtos de hidrólise, produzindo complexos mistos no meio, o que pode ser um interferente para os resultados obtidos. A fim de investigar a formação e os produtos de hidrólise foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

Na Figura 7 são apresentados os cromatogramas do NF, NFOH, e complexo (NFOH:HP- $\beta$ -CD) no momento inicial e após um período de 100 h, sob agitação a 25 °C.

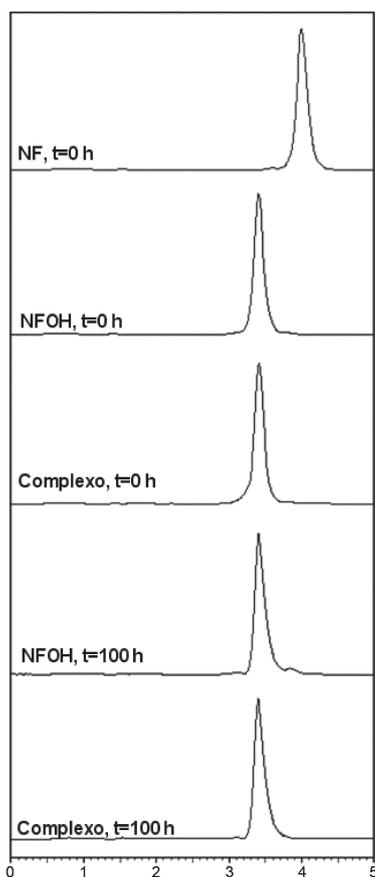
A partir da Figura 7 pode-se observar que no momento inicial (0 h), o tempo retenção do NF (4 min) difere do tempo de retenção do NFOH (3,4 min) e que este último não apresenta produtos de hidrólise.

Após um período de 100 h em que o NF, NFOH e complexo foram deixados sob agitação a 25 °C, não se observa variação nos cromatogramas do NF (dado não mostrado), bem como do NFOH (sozinho ou em presença de ciclodextrina).

Sendo assim, nestas condições experimentais o NFOH não apresentou hidrólise, indicando que os resultados obtidos para a complexação do NFOH com HP- $\beta$ -CD são realmente destas duas substâncias e não de possíveis interferentes, como seus produtos de hidrólise.

### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apresentam a caracterização físico-química da complexação do composto com atividade antichagásica, NFOH e HP- $\beta$ -CD. O trabalho mostra que a complexação do NFOH



**Figura 7.** Cromatogramas obtidos para NF, NFOH e complexo em função do tempo ( $t=0$  e  $100$  h), [fármaco]= $40 \mu\text{M}$ ,  $25^\circ\text{C}$ . Condições cromatográficas descritas em métodos

causa mudanças nas propriedades deste fármaco, como um aumento na solubilidade e modificação no seu perfil de liberação. Estas mudanças são importantes na aplicabilidade deste composto, podendo causar melhoras na biodistribuição do mesmo. Na interação do NFOH com HP- $\beta$ -CD mostrou-se que a temperatura é um fator determinante na complexação e que este é um processo energeticamente favorável. Os valores de constante de estabilidade determinados, relativamente baixos, garantem que a liberação do fármaco seja modificada quando comparada ao fármaco sozinho. Este trabalho abre perspectivas para estudos de avaliação de atividade biológica, citotoxicidade, a fim de gerar uma possível nova alternativa no tratamento da doença de Chagas.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (Proc. Nº 05/03045-9) e bolsas de iniciação científica (C. M. Moraes, Proc. Nº 04/02091-4 e R. Grillo, Proc. Nº 06/00787-7) e à CAPES (C. M. S. Menezes - Prodoc 00019-08-03). Os autores agradecem a também aos comentários e sugestões dos assessores.

## REFERÊNCIAS

- Dias, J. C. P.; *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*, Atheneu Ed.: São Paulo, 1999.
- Andrade, Z. A.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1999**, *94*, 71.
- Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Netto, M. Em *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*; Brener, Z.; Zilton, A. A.; Barral-Netto, M., eds.; 2ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- Schmuñis, G. A. Em ref. 3
- Urbina, J. A.; Docampo, R.; *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 495.
- Coura, J. R.; Castro, S. L. A.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3.
- Gonçalves, M. F.; Chung, M. C.; Colli, W.; Miranda, M. T. M.; Ferreira, E. I.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1994**, *27*, 164.
- Chung, M. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1996.
- Guido, R. V. C.; Ferreira, E. I.; Nassute, J. C.; Varanda, E. A.; Chung, M. C.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2001**, *22*, 319.
- Chung, M. C.; Guido, R. V. C.; Martinelli, T. F.; Gonçalves, M. F.; Polli, M. C.; Botelho, K. C. A.; Varanda, E. A.; Colli, W.; Miranda, M. T.; Ferreira, E. I.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4779.
- Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R.; *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 413.
- Liu, R.; *Water Insoluble Drug Formulation*, Interpharm/CRC Press: New York, 2000.
- Davis, M. E.; Brewster, M. E.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 1023.
- de Araújo, D. R.; Pinto, L. M. A.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2003**, *53*, 663.
- Frömming, K. H.; Szejtli, J.; *Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publishers: Hungria, 1994.
- de Azevedo, M. B. M.; Alderete, J. B.; Rodriguez, J. A.; Souza, A. O.; Rettori, D.; Torsoni, M. A.; Faljoni-Alario, A.; Haun, M.; Duran, N.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *37*, 93.
- Connors, K. A.; *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325.
- Ismaili, L.; André, C.; Nicod, L.; Mozer, J. L.; Millet, J.; Refouvet, B.; Makki, S.; Robert, J. F.; Xicluna, A.; Guillaume, Y. C.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 871.
- Ravelet, C.; Ravel, A.; Grosset, C.; Villet, A.; Geze, A.; Wouessidjewe, D.; Peyrin, E.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2002**, *25*, 421.
- Ravelet, C.; Geze, A.; Villet, A.; Grosset, C.; Ravel, A.; Wouessidjewe, D.; Peyrin, E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 425.
- Paavola, A.; Yliruusi, J.; Kajimoto, Y.; Kalso, E.; Wahlström, T.; Rosenberg, P.; *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1997.
- de Araújo, D. R.; Fraceto, L. F.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2005**, *55*, 316; Pinto, L. M. A.; Fraceto, L. F.; Santana, M. H. A.; Pertinhez, T. A.; Oyama Junior, S.; de Paula, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *30*, 956; de Jesus, M. B.; Pinto, L. M. A.; Fraceto, L. F.; Takahata, Y.; Lino, A. C. S.; Jaime, C.; de Paula, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1428.
- Matioli, G.; *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*, EDUEM: Maringá, 2000.
- Dodziuk, H.; *Cyclodextrins and their complexes*, Wiley-VCH: Germany, 2006.
- Szejtli, J.; *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon: Oxford, 1996.
- Másson, M.; Loftsson, T.; Másson, G.; Stefánsson, E.; *J. Controlled Release* **1999**, *59*, 107.
- Bekers, O.; Uijtendaal, E. V.; Beijnen, J. H.; Bult, A.; Underberg, W. J. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1991**, *17*, 1503.
- Flood, K. G.; Reynolds, E. R.; Snow, N. H.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *903*, 49; Tong, W. Q.; Lach, J. L.; Chin, T. F.; Guillory, J. K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1991**, *9*, 1139; Stalcup, A. M.; Chang, S. S.; Armstrong, D. W.; Pitha, J. J.; *J. Chromatogr. A* **1990**, *513*, 181; Morin, N.; Guillaume, Y. C.; Peyrin, E.; Rouland, J. C.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *808*, 51; Del Valle, E. M. M.; *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033; Moraes, C. M.; Abrami, P.; de Paula, E.; Braga, A. F. A.; Fraceto, L. F.; *Int. J. Pharm.* **2007**, *331*, 99.
- Langerman, L.; Grant, G. J.; Zakowski, M.; Golomb, E.; Ramanathan, S.; Turndorf, H.; *Anesth. Analg.* **1992**, *75*, 900.
- Mowat, J. J.; Mok, M. J.; MacLeod, B. A.; Madden, T. D.; *Anesthesiology* **1996**, *85*, 635.
- Moraes, C. M.; Abrami, P.; Gonçalves, M. M.; Andreo-Filho, N.; Fernandes, S. A.; de Paula, E.; Fraceto, L. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 777; Moraes, C. M.; Abrami, P.; de Araújo, D. R.; Braga, A. F. A.; Issa, M. G.; Ferraz, H. G.; de Paula, E.; Fraceto, L. F.; *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 313; Moraes, C. M.; Abrami, P.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; Fraceto, L. F.; *Int. J. Pharm.* **2007**, *331*, 99.