UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Dispersões sólidas de ácido ursólico para otimização do
tratamento da doença de Chagas**

Josimar de Oliveira Eloy

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado: Josimar de Oliveira Eloy

Orientadora: Juliana Maldonado
Marchetti

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Eloy, Josimar de Oliveira

Dispersões sólidas de ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas. Ribeirão Preto, 2012.

96 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Dispersões Sólidas. 2. Solubilidade. 3. Ácido Ursólico. 4. Doença de Chagas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Josimar de Oliveira Eloy

Dispersões sólidas de ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Juliana Maldonado
Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico este trabalho àqueles que
me presenteiam com seu apoio e amor
incondicional: minha mãe, meu irmão
e minha namorada, Raquel.**

Agradecimento

Aos meus pais, por me proporcionarem uma educação de qualidade, especialmente à minha mãe, por sempre apoiar e incentivar os meus estudos. Mãe, obrigado simplesmente por ser assim;

Ao meu irmão Bruno, por sempre estar presente nos momentos bons e ruins, sendo um amigo do qual jamais posso me queixar;

À minha namorada Raquel, não somente pelo amor que me prova diariamente, mas por toda a ajuda na execução deste trabalho, servindo como interlocutora desde as dúvidas mais banais, às decisões mais importantes, e inclusive por ler os meus textos sempre com muito cuidado e competência;

À minha orientadora, a Ju, por acreditar e estimular o meu potencial acadêmico, sendo um elemento fundamental neste meu caminho rumo ao meu objetivo: tornar-me um pesquisador e professor universitário. Gostaria de destacar o carinho e humildade com que trata seus alunos;

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Erika, Samantha, Marina, Juliana e Mayara, sempre companheiras e parceiras na minha pesquisa;

Às minhas amigas Livia Carvalho e Thais Mitleton, por me ajudarem e aconselharem na importante decisão de transição da indústria para a universidade. O carinho e amizade de vocês são muito valiosos;

Aos meus companheiros Henrique, José Orestes e Fabíola por sempre me ajudarem em diversos pontos. Em resumo, o apoio de vocês na realização deste trabalho foi fundamental;

Aos técnicos José Clovis do Prado Júnior, pela ajuda com análises de FTIR, Cristiana Gonçales e Geórgius Luiz de Oliveira pelo enorme suporte com os experimentos no laboratório de parasitologia;

À Juliana Saraiva, por confiar em mim e apoiar o meu trabalho, colaborando imensamente com os estudos de parasitologia desta pesquisa;

Aos professores Sérgio Albuquerque, Oswaldo de Freitas, e Roberto Santana por me permitirem usar os seus laboratórios;

À Fabiana Vicentini, à professora Maria Vitória e ao professor Luiz Alexandre pela importante contribuição na qualificação do meu mestrado.

RESUMO

ELOY, J.O. **Dispersões sólidas de ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A doença de Chagas representa um grave problema de saúde pública, afetando principalmente a população de baixa renda, o que a torna negligenciada pela indústria farmacêutica. Atualmente, existe apenas um fármaco disponível para o tratamento, o benzonidazol, porém este apresenta eficácia limitada e está associado a diversos efeitos colaterais. O ácido ursólico, um triterpeno de origem natural, possui atividade tripanocida, porém, sua solubilidade aquosa baixa limita sua biodisponibilidade. Para o aumento da biodisponibilidade tem destaque o uso das dispersões sólidas, onde fármacos lipofílicos são dispersos molecularmente ou no estado amorfo em carreadores hidrofílicos, acarretando um aumento do perfil de dissolução. Neste trabalho, dispersões sólidas e misturas físicas contendo ácido ursólico foram preparadas com os carreadores polietilenoglicol 6000, Gelucire 50/13 e dióxido de silício coloidal, Poloxamer 407 e caprato de sódio, empregando as técnicas de fusão e evaporação do solvente. Os sistemas foram caracterizados através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial, microscopia em *hot stage* e difratometria de raios-X. Em outra etapa, os produtos foram avaliados quanto à solubilidade aquosa, perfil de dissolução *in vitro*, citotoxicidade em linhagem celular LLC-MK2, e atividade tripanocida em modelo animal. Em conjunto, os resultados mostraram que o fármaco não teve suas propriedades afetadas pela manipulação em misturas físicas, mantendo sua estrutura cristalina. Por outro lado, os experimentos de difratometria de raios-X e as observações microscópicas em *hot stage* revelaram a alteração do ácido ursólico para o estado amorfo, principalmente para os sistemas preparados pelo método do solvente, enquanto que algumas formulações manipuladas pelo método da fusão exibiram alterações polimórficas. Além disso, evidenciaram-se interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio para as dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente. As alterações do fármaco observadas para as dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente aumentaram sua solubilidade e melhoraram seu perfil de dissolução comparado às dispersões sólidas pelo método da fusão e misturas físicas, sendo este aumento maior para os sistemas compostos por Poloxamer 407 + caprato de sódio, seguido por Poloxamer 407, Gelucire 50/13 + dióxido de silício coloidal e PEG 6000, o que pode ser atribuído ao poder tensoativo dos três primeiros carreadores. As formulações mostram-se seguras até a concentração de 128 µM do fármaco, através da avaliação da citotoxicidade. Por último, o ursólico teve um aumento significativo da atividade tripanocida para a formulação composta pelo tensoativo Poloxamer 407 junto com o promotor de absorção oral caprato de sódio, manipulada pelo método do solvente, sugerindo o aumento da biodisponibilidade do fármaco.

Palavras-chave: Dispersões Sólidas, Solubilidade, Ácido Ursólico, Doença de Chagas.

ABSTRACT

ELOY, J. O. **Solid dispersions containing ursolic acid for the treatment optimization of Chagas disease.** Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Chagas disease represents a severe problem in public health, affecting mainly the low-income population, making it neglected by the pharmaceutical industry. Currently, there is only one drug available for treatment, benznidazol, however, it presents limited efficacy and is associated with several side effects. Ursolic acid, a naturally occurring triterpene, presents trypanocidal activity, but its low water solubility limits the bioavailability. To increase the bioavailability, solid dispersions, where lipophilic drugs are molecularly or in the amorphous state dispersed in hydrophilic carriers, can play an important role, resulting in enhanced dissolution profile of the drug. In this work, solid dispersions and physical mixtures containing ursolic acid were prepared with Polyethyleneglycol 6000, Gelucire 50/13 and silicon dioxide, Poloxamer 407 and sodium caprate as carriers, employing the fusion and solvent evaporation techniques. The products were characterized through scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, hot stage microscopy and X-ray diffractometry. In another step, the formulations were evaluated regarding the aqueous solubility, *in vitro* dissolution profile, cytotoxicity using LLC-MK2 cell line, and trypanocidal activity in animal model. Together, results showed that the drug did not suffer any change in its properties when in physical mixture. On the other hand, X-ray diffractometry and hot stage microscopy revealed a transition from the crystalline to the amorphous state for ursolic acid, especially for the products prepared by the solvent method. In the fusion method, some formulations exhibited a polymorphic change. Moreover, we identified intermolecular interactions between drug and carrier by hydrogen bonding in the products prepared by the solvent method. These changes observed for solid dispersions prepared by the solvent method resulted in increased water solubility and dissolution profile and these effects were higher for the products prepared with Poloxamer 407 + sodium caprate, followed by Polomer 407 alone, Gelucire 50/13 + silicon dioxide and PEG 6000, which can be attributed to the surfactant property of the three first carriers. The formulations were safe up to 128 μM of the drug, showed by the cytotoxicity evaluation. Very importantly, we highlight that ursolic acid had a significant increase in the trypanocidal activity for the product prepared with the surfactant Poloxamer 407 and the penetration enhancer sodium caprate, prepared by the solvent method, suggesting that in this composition ursolic acid was more bioavailable.

Keywords: Solid Dispersions, Solubility, Ursolic Acid, Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transmissão da doença de Chagas inseto – hospedeiro (adaptado de ROMERO; MORILLA, 2010)	03
Figura 2. (a) Tripomastigotas circulantes e (b) pseudocistos de amastigotas de um caso agudo de doença de Chagas. (c) Fibrose dos sistemas condutores e (d) hipertrofia do miocárdio na fase crônica da doença de Chagas (COURA et al., 2007)	04
Figura 3. Estrutura química do ácido ursólico.....	07
Figura 4. Representação esquemática da organização molecular de fármacos em dispersões sólidas (adaptado de DIHENDRA et al, 2009).	10
Figura 5. Estrutura química do polietilenoglicol.....	11
Figura 6. Estrutura química do poloxamer.....	12
Figura 7. Fases da pesquisa em dispersões sólidas (adaptado de VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).	13
Figura 8. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do fármaco, PEG 6000, PEGMF003, PEGDSS003 e PEGDSF003, obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Escala de 1 µm para o fármaco e 10 µm para as demais amostras.	38
Figura 9. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do fármaco, Gelucire 50/13, dióxido de silício coloidal, GELMF003, GELDSS003 e GELDSF003, obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Escala de 1 µm para o fármaco e 10 µm para as demais amostras.	39
Figura 10. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do fármaco, Poloxamer 407, POLMF003, POLDSS003 e POLDSF003, obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Escala de 1 µm para o fármaco e 10 µm para as demais amostras.	39
Figura 11. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, polietilenoglicol 6000, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.	41
Figura 12. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, dióxido de silício, Gelucire 50/13, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.	42

Figura 13. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, Poloxamer 407, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.	43
Figura 14. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, Poloxamer 407, caprato de sódio misturas físicas e dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente.	45
Figura 15. Curvas de DSC de ácido ursólico, polietilenoglicol 6000, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método da fusão e dispersão sólida preparada pelo método do solvente	47
Figura 16. Curvas de DSC de ácido ursólico, Gelucire 50/13, dióxido de silício, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método da fusão e dispersão sólida preparada pelo método do solvente.	47
Figura 17. Curvas de DSC de ácido ursólico, Poloxamer 407, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método da fusão e dispersão sólida preparada pelo método do solvente.	48
Figura 18. Fotomicrografias de <i>hot stage</i> do fármaco, carreador, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão, a temperatura ambiente (A) e a 200°C (B).	50
Figura 19. Fotomicrografias de <i>hot stage</i> do fármaco, carreador, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão, a temperatura ambiente (A) e a 200°C (B).	51
Figura 20. Fotomicrografias de <i>hot stage</i> do fármaco, carreador, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão, a temperatura ambiente (A) e a 200°C (B).	51
Figura 21. Difratograma de raios-X do fármaco, PEG 6000, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.	53
Figura 22. Difratograma de raios-X do fármaco, carreadores Gelucire 50/13 e dióxido de silício coloidal, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.	54

Figura 23. Difratoograma de raios-X do fármaco, Poloxamer 407, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.	54
Figura 24. Difratoograma de raios-X do fármaco, carreadores Poloxamer 407 e caprato de sódio, misturas físicas (esquerda) e dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente (direita).	55
Figura 25. Cromatograma do ácido ursólico.....	56
Figura 26. Curva analítica.....	58
Figura 27. Solubilidade do ácido ursólico em dispersões sólidas preparadas com diferentes proporções de carreador PEG 6000.	62
Figura 28. Solubilidade do ácido ursólico em misturas físicas, dispersões sólidas preparadas pelo método da fusão e do solvente, com diferentes proporções de carreadores Gelucire 50/13 e dióxido de silício coloidal.	64
Figura 29. Solubilidade do ácido ursólico em misturas físicas, dispersões sólidas preparadas pelo método da fusão e do solvente, com diferentes proporções de carreador Poloxamer 407. * $P < 0.05$ (teste t de student).	65
Figura 30. Solubilidade do ácido ursólico em misturas físicas e dispersões sólidas preparadas do solvente, com diferentes proporções de carreador caprato de sódio.	66
Figura 31. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico como fármaco livre, em mistura física, em dispersões sólidas com Gelucire 50/13 e SiO ₂ , preparadas pelos métodos da fusão e solvente em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8, suplementado com 1% de lauril sulfato de sódio.	68
Figura 32. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico em mistura física, em dispersões sólidas com Poloxamer 407 preparadas pelos métodos da fusão e solvente em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8.	69
Figura 33. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico em mistura física, em dispersões sólidas com Poloxamer 407 preparadas pelos métodos da fusão e solvente em solução de HCl 0,1N.	70
Figura 34. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico em misturas físicas e em dispersões sólidas preparadas pelo método solvente com diferentes proporções do carreador caprato de sódio, em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8.	71

- Figura 34.** Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico em misturas físicas e em dispersões sólidas preparadas pelo método solvente com diferentes proporções do carreador caprato de sódio, em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8. 71
- Figura 35.** Citotoxicidade em linhagem celular LLC-MK2 do ácido ursólico em dispersões sólidas e controles sem fármaco. 72
- Figura 36.** Curva parasitêmica de camundongos infectados com 2×10^4 formas tripmastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas por administração oral de ácido ursólico (20mg/Kg/dia), em mistura física (POLMF003), dispersão sólida preparada pelo método da fusão (POLDSF003) e dispersão sólida preparada pelo método do solvente (POLDSS003), controles negativos sem tratamento e tratados com solução de Poloxamer 407, e o controle positivo com benzonidazol (20 mg/Kg/dia). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (teste t de student). 74
- Figura 37.** Parasitemia de camundongos infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* nos dias 10, 14 e 21 após a infecção (dpi) e tratados por administração oral de ácido ursólico (20mg/Kg/dia), em mistura física (POLMF003), dispersão sólida preparada pelo método da fusão (POLDSF003) e dispersão sólida preparada pelo método do solvente (POLDSS003), controles negativos sem tratamento, tratados com solução de Poloxamer 407, e o controle positivo com benzonidazol (20 mg/Kg/dia).). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (teste t de student). 75
- Figura 38.** Curva parasitêmica de camundongos infectados com 2×10^4 formas tripmastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas por administração oral de ácido ursólico (20mg/Kg/dia), em dispersão sólida com 10% de caprato de sódio (CAPDSS001), com 20% de caprato de sódio (CAPDSS002), com 50% de caprato de sódio (CAPDSS003), controles negativos sem tratamento e tratados com solução de caprato de sódio, e o controle positivo com benzonidazol (20 mg/Kg/dia). *** $P < 0.001$ (teste t de student). 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Código das formulações desenvolvidas com diferentes carreadores, métodos de preparo e porcentagens de fármaco.	28
Tabela 2 – Precisão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico	59
Tabela 3 – Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico	59
Tabela 4 – Teor de ácido ursólico em formulações.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization
AU	Ácido Ursólico
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
PVP	Polivinilpirrolidona
PEG	Polietilenoglicol
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
EC	Eletroforese Capilar
FTIR	Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
HSM	Microscopia em <i>Hot Stage</i>
DRX	Difratometria de raios-X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos
POL	Poloxamer
GEL	Gelucire
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coeficiente de Variação

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas e siglas	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2 Medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas	4
1.3 Ácido ursólico	6
1.4 Administração oral e biodisponibilidade	7
1.5 Dispersões sólidas	9
1.6 Caracterização físico-química	14
1.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	14
1.6.2 Espectroscopia do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	15
1.6.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	15
1.6.4 Microscopia em <i>hot stage</i> (HSM)	16
1.6.5 Difractometria de raios-X (DRX)	16
1.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	17
1.7 Avaliação	18
1.7.1 Solubilidade	18
1.7.2 Perfil de dissolução	19
1.7.3 Citotoxicidade	20
1.7.4 Atividade tripanocida	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Materiais	25
3.1.1 Substâncias químicas	25
3.1.2 Equipamentos e acessórios	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Preparação das dispersões sólidas e misturas físicas	26
3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	29
3.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	29
3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial	29
3.2.5 Microscopia em <i>Hot Stage</i>	30
3.2.6 Difração de Raios-X	30
3.2.7 Condições cromatográficas	30
3.2.8 Validação do método analítico	31
3.2.8.1 Seletividade	31
3.2.8.2 Linearidade	31
3.2.8.3 Precisão e exatidão	32
3.2.8.4 Limite de detecção e quantificação	32

3.2.9 Determinação do teor de ácido ursólico em formulações.....	33
3.2.10 Determinação da solubilidade	33
3.2.11 Estudos de dissolução.....	34
3.2.12 Avaliação da citotoxicidade	34
3.2.13 Ensaio biológico <i>in vivo</i>	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Caracterização	37
4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
4.1.2 Espectroscopia do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)....	40
4.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	45
4.1.4 Microscopia em <i>hot stage</i> (HSM).....	48
4.1.5 Difração de raios X(DRX).....	52
4.1.6 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico	55
4.1.6.1 Validação do método analítico.....	57
4.1.6.1.1 Seletividade.....	57
4.1.6.1.2 Linearidade.....	57
4.1.6.1.3 Precisão e exatidão.....	58
4.1.6.1.4 Limite de detecção e quantificação.....	60
4.1.6.2 Determinação do teor de ácido ursólico em formulações.....	60
4.2. Avaliação.....	62
4.2.1 Solubilidade.....	62
4.2.2 Perfil de dissolução	66
4.2.3 Citotoxicidade.....	72
4.2.4 Atividade tripanocida	73
5. CONCLUSÃO	78
6. REFERÊNCIAS.....	80

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

Reconhecida pela OMS como uma patologia negligenciada, a doença de Chagas constitui um problema social e econômico relevante em muitos países da América Latina, desde a antiguidade até os dias de hoje (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Acomete 28 milhões de pessoas (WHO, 2005), principalmente na América Latina, com mais de 3,0-3,3 milhões de casos sintomáticos e incidência de 200 mil novos casos por ano (MOREL; LAZDINS, 2003). A prevalência da doença corresponde a 1,4% da população latino-americana e a estimativa é de 14.000 mortes por ano (HOTEZ et al., 2008) O agente etiológico da doença, *Trypanosoma cruzi*, pode ser transmitido pelas fezes infectadas de triatomíneos hematófagos, por transfusão sanguínea, fatores congênitos e, raramente, por transplante de órgão, ingestão de alimento contaminado e acidentes laboratoriais (PRATA, 2001)

A frequência de infecção por seres humanos pela transmissão vetorial está relacionada com o nível econômico da população e com a capacidade de instalação do vetor em residências precárias. A enfermidade continuará a ser transmitida nas áreas rurais ou periurbanas das Américas onde a condição de vida da população permite o contato íntimo entre os triatomíneos infectados e o hospedeiro humano (WHO, 1991).

Apesar dos avanços no controle da transmissão vetorial, a principal via de transmissão do parasita, algumas áreas na América Latina ainda apresentam níveis significativos deste tipo de transmissão e mesmo nas áreas onde esta foi declarada nula, existe o risco de retorno em consequência de precoce interrupção nos programas de vigilância (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002) No contexto epidemiológico da doença de Chagas no Brasil, a região nordeste contribui de forma significativa, uma vez que, as condições precárias das moradias favorecem o desenvolvimento do triatomíneo (VINHAES, 2002).

O protozoário flagelado *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (HOARE, 1966). Seu ciclo biológico envolve um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (vetor), podendo ser encontrados nas formas amastigotas, nos tecidos e em cultura de células (replicação intracelular);

epimastigotas, no vetor; tripomastigotas, no sangue e em cultura de células (infectante). *Trypanosoma cruzi* vivia restrito ao ambiente silvestre, circulando entre mamíferos e hemípteros da fauna natural. Foi o homem, invadindo esses ecótopos, que fez incluir o homem ao ciclo do hemíptero (DIAS; COURA, 1997).

A doença apresenta curso clínico variável, desenvolvendo fase aguda, indeterminada e crônica, que varia de acordo com as características do hospedeiro e da cepa infectante. A sintomatologia geralmente se manifesta por comprometimento cardiovascular e /ou gastrointestinal que resultam em significativa morbidade e em aproximadamente 14 mil mortes anuais (HIGUCHI et al., 2003; WHO, 2005).

Atualmente, milhões de pacientes permanecem sem tratamento adequado para esta patologia debilitante e potencialmente fatal e, somente 1% dos infectados recebem algum tipo de tratamento (RIBEIRO, et al., 2009).

Figura 01. Transmissão da doença de Chagas inseto – hospedeiro (adaptado de ROMERO; MORILLA, 2010)

Figura 02. (a) Tripomastigotas circulantes e (b) pseudocistos de amastigotas de um caso agudo de doença de Chagas. (c) Fibrose dos sistemas condutores e (d) hipertrofia do miocárdio na fase crônica da doença de Chagas (COURA et al., 2007)

1.2 Medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas

Para que um fármaco seja eficaz contra a doença de Chagas, este deve ser capaz de atuar sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*, ou seja, os elementos de reprodução celular nos animais mamíferos, já que as formas epimastigotas e tripomastigotas derivam das primeiras e por consequência a resposta destas aos medicamentos tem menor importância (TEXEIRA; NASCIMENTO; STURN, 2006).

Desde o final de 1960 e 1970 somente dois fármacos têm sido utilizados para o tratamento da doença de Chagas: nifurtimox (LAMPIT[®]/BAYER) e benzonidazol (ROCHAGAN[®]/ROCHE) (RICHLE, 1973). Após a proibição no Brasil do nifurtimox nos anos 80, o ROCHAGAN[®] passou a ser o único medicamento com atividade tripanocida disponível no mercado. Todavia, este medicamento apresenta limitada eficácia clínica limitada na fase crônica da infecção e vários efeitos colaterais, tais como dermatite, depressão da medula óssea, agranulocitose e trombocitopenia (PEDROSA et al., 2001).

O violeta de genciana é o único composto efetivo para quimioprevenção. Contudo, apesar de sua eficácia, existem algumas restrições ao seu uso, como por

exemplo, a coloração violácea induzida no sangue tratado, sendo detectada posteriormente nos tecidos. Além desta, existe a limitação da ação mutagênica causada por este composto (CHIARI et al., 1996).

Passado um século após da descoberta de Chagas, houve progresso no entendimento e no controle da doença, mas muito ainda deve ser feito para otimização da terapia, considerando as limitações dos fármacos atualmente empregados (RIBEIRO et al., 2009).

Durante muito tempo, pesquisas apontaram que a doença de Chagas em sua fase crônica possui um mecanismo autoimune e, portanto, deveria ser tratada como tal. Esta perspectiva deteve o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários para o tratamento da fase crônica da infecção. Entretanto, pesquisas demonstraram que há persistência do parasita na fase crônica da doença, originando lesões (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Deve-se considerar ainda o fato desta doença afetar principalmente populações de baixa renda da Ásia, África e América Latina, despertando pouco interesse da indústria farmacêutica (TROUILLER et al., 2002). Além disso, entre 60 e 80% dos pacientes portadores da doença de Chagas apresentam um período crônico do tipo indeterminado, ou seja, não apresentam sinais e sintomas e os exames de laboratório rotineiros são normais: radiografias de tórax, eletrocardiograma, radiografia de esôfago, estômago e duodeno, hemograma e perfil bioquímico. De 50 a 55% destes pacientes permanecerão nesta etapa por toda a sua vida, outros pacientes depois de um tempo variável apresentarão alterações cardíacas (30-40%), digestivas ou ambas (WERNER; INÉS, 2011)

Em face da necessidade de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas, novos compostos com capacidade de atuar sobre o parasita e desprovidos de efeitos colaterais tem sido estudados. Neste contexto, muitos produtos naturais e sintéticos estão sendo avaliados com relação à atividade tripanocida, o que pode levar ao desenvolvimento de medicamentos efetivos para o tratamento da doença de Chagas (COURA; de CASTRO, 2002).

Dentre os fármacos que poderão ser utilizados, podemos citar os inibidores de protease, piridinas, nitroimidazóis, azóis, inibidores da síntese do esqualeno, inibidores da síntese do farnesil-pirofosfato, inibidores da síntese do dihidrofolato redutase e os produtos naturais (RIBEIRO et al., 2009).

A investigação de novas estratégias terapêuticas contra a doença de Chagas permanece prioritária na pesquisa de doenças tropicais. Infelizmente, a doença de Chagas permanece negligenciada com relação ao desenvolvimento de medicamentos para controlar esta doença (GUEDES et al., 2011).

1.3 Ácido ursólico

O ácido ursólico (AU), ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico (Figura 3), é um triterpeno (C30) pentacíclico e normalmente surge associado ao seu isômero, o ácido oleanólico (FERREIRA et al., 2010; LIU, 2005). Amplamente distribuído no reino vegetal, está presente em muitas ervas medicinais e outras plantas, incluindo ginseng (*Panax ginseng*), calêndula (*Callendula officinalis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), melaleuca (*Melaleuca leucadendron*), maçã (*Malus domestica*), pêra (*Pyrus pyrifolia*), ameixa (*Prunus domestica*), entre outras (LIU, 2005; PRASAD et al., 2011). O ácido ursólico tem uso consagrado na cosmética devido às suas ações antioxidante e renovadora celular (HAIDA et al., 2011).

O interesse na pesquisa deste triterpenóide tem crescido em função da descoberta de diversas propriedades farmacológicas, incluindo a atividade hepatoprotetora (LIU, 1995), tornando o fármaco útil no tratamento da hepatite crônica, aguda, bem como outras desordens hepáticas. Este triterpeno apresenta propriedade hepatoprotetora por meio da diminuição da necrose de células parenquimatosas do fígado, fibrose, prevenção da cirrose hepática e intensificação da regeneração do fígado (JEONG; KIM; HWANG, 2005). Também foram relatados efeitos cardiovasculares benéficos (SOMOVA et al., 2003), atividade anti-inflamatória (VASCONCELOS et al., 2006), atividade antidiabética (WANG et al., 2010) e atividade antitumoral (BONACCORSI et al., 2008), na qual os triterpenos ácidos podem atuar em vários estágios no desenvolvimento de tumores, como na inibição da tumorigênese, inibição da progressão do tumor e indução da diferenciação tumoral (OVESNA et al., 2004). A atividade antimicrobiana também foi relatada por CUNHA et al., (2006).

Pesquisas demonstraram a atividade tripanocida do ácidos ursólico e também oleanólico (CUNHA et al., 2006; FERREIRA et al., 2010). Observou-se maior atividade do ácido ursólico contra os parasitas em testes *in vitro* e *in vivo*, quando comparado ao ácido oleanólico (FERREIRA et al., 2010).

Apesar da ampla gama de atividades farmacológicas atribuídas ao ácido ursólico, o que pode limitar o seu uso, e também do seu isômero, é a solubilidade aquosa baixa, o que limita a biodisponibilidade. Esforços têm sido feitos para melhorar a solubilidade do ácido ursólico através de modificações químicas (LIU, 2005). Além esta alternativa, estratégias farmacotécnicas também podem ser utilizadas visando ao aumento da solubilidade deste triterpenóides, como a complexação com ciclodextrinas (LI, et al., 2009). O uso de nanosuspensões (CHEN, et al., 2005), de nanoemulsões (XI et al., 2009) e dispersões sólidas (THI, 2003) já foram pesquisadas para o ácido oleanólico e resultados satisfatórios foram obtidos.

Figura 03 – Estrutura química do ácido ursólico

1.4 Administração oral e biodisponibilidade

A via oral é a maneira mais simples, fácil e conveniente de administração de medicamentos, especialmente para o tratamento de enfermidades crônicas, como a

doença de Chagas. As vantagens de uma forma farmacêutica sólida para uso oral em relação às demais incluem a maior estabilidade, facilidade de produção e administração conveniente e segura por parte dos pacientes. Por esses motivos, a maior parte dos medicamentos é atualmente lançada no mercado como formas farmacêuticas sólidas, que originem concentração plasmática *in vivo* efetiva e reprodutível, após a administração oral (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

A biodisponibilidade de um fármaco será baixa após a administração oral, caso o mesmo não seja completamente dissolvido e/ou absorvido no intestino delgado, principal sítio de absorção de fármacos no trato gastrointestinal (STREUBEL et al., 2006). Por este motivo, estratégias para o aumento da biodisponibilidade devem ser buscadas no processo de desenvolvimento de um medicamento para fármacos que apresentem biodisponibilidade limitada.

A biodisponibilidade de um fármaco pode ser prevista através do sistema de classificação para compostos farmacêuticos, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que considera solubilidade e permeabilidade, de acordo às seguintes categorias: alta solubilidade e alta permeabilidade (Classe 1), baixa solubilidade e alta permeabilidade (Classe 2), alta solubilidade e baixa permeabilidade (Classe 3) e baixa solubilidade e baixa permeabilidade (Classe 4). Para casos de fármacos da Classe 2, e possivelmente da Classe 4, que apresentem baixa biodisponibilidade, o uso de diferentes formas sólidas (por exemplo, sais e dispersões sólidas) pode ser empregado para contornar o problema (WU; BENET, 2005).

É importante notar que aproximadamente 40% dos novos princípios ativos são rejeitados pela indústria farmacêutica e nunca irão beneficiar um paciente devido à sua baixa disponibilidade biológica ocasionada por propriedades intrínsecas do estado sólido, como a solubilidade, ou devido à permeabilidade deficiente em membranas biológicas. Adicionalmente, cerca de 70% desses fármacos lançados no mercado exibem desempenho subutilizado pelas mesmas razões (SVENSON, 2009). Por estes motivos, julga-se relevante utilizar as ferramentas que a tecnologia farmacêutica oferece para contornar o problema da baixa biodisponibilidade.

O alto custo do desenvolvimento de novos medicamentos tem motivado a indústria farmacêutica a buscar estratégias para acelerar o processo de desenvolvimento, de forma a disponibilizar o medicamento ao mercado em menor tempo, com custos reduzidos. Uma estratégia promissora é utilizar a química do estado sólido para modificar propriedades dos fármacos, que possam trazer inconvenientes que limitem a veiculação dos mesmos em medicamentos seguros, eficazes e com preço acessível (ENGERS et al., 2010).

1.5 Dispersões sólidas

Dispersões sólidas podem ser definidas como misturas de fármacos com baixa solubilidade aquosa no estado molecular ou amorfo, em carreadores hidrofílicos, apresentando perfil de dissolução do fármaco dirigido pelas propriedades do polímero (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA; 2007).

A melhora do perfil de dissolução de um fármaco em função da utilização de dispersão sólida pode ser explicada através dos seguintes fenômenos: redução do tamanho de partícula, o que tem o máximo efeito no caso de dispersões sólidas do tipo dispersões moleculares; melhora da molhabilidade do fármaco pelo polímero hidrofílico, mesmo na ausência de um agente tensoativo compondo o sistema disperso; aumento da porosidade, que depende das características do polímero carreador; fármaco no estado amorfo, que apresenta maior solubilidade em comparação com sua forma cristalina e interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre fármaco e carreador (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA; 2007; CRAIG, 2002).

Figura 04. Representação esquemática da organização molecular de fármacos em dispersões sólidas (adaptado de DIHENDRA et al, 2009).

A primeira geração de dispersões sólidas, descritas por SEKIGUCHI e OBI, em 1961, envolveu a formulação de misturas eutéticas de fármacos e carreadores cristalinos altamente hidrofílicos, como a uréia. Foi observada a melhora da taxa de dissolução do fármaco, e, por consequência, de sua biodisponibilidade. Outras abordagens mais vantajosas foram pesquisadas, como o preparo de soluções sólidas, através de dispersões moleculares, ao invés das misturas eutéticas (LEUNER; DRESSMAN, 2000).

A segunda geração de dispersões sólidas empregou o uso de polímeros amorfos, ao invés de carreadores cristalinos, observando vantagens em relação ao aumento de solubilidade. As dispersões sólidas amórficas podem ser classificadas em soluções e suspensões sólidas, ou mistura de ambas, de acordo às interações moleculares entre o fármaco e o carreador hidrofílico. Em soluções amórficas sólidas, o fármaco e o polímero carreador são completamente miscíveis e solúveis, originando interação molecular homogênea entre eles. No caso das suspensões sólidas amórficas, o fármaco tem limitada solubilidade no carreador. Dessa maneira, do ponto de vista molecular, o sistema é composto por duas fases (VASCONCELOS; SARMENTO, COSTA, 2007).

Os polímeros carreadores mais comumente utilizados dividem-se em dois grupos, sintéticos e naturais. Os polímeros sintéticos incluem polivinilpirrolidonas (PVP), polietilenoglicol (PEG) e polimetacrilados. Polietilenoglicóis, polímeros de óxido de etileno com massa molecular variando de 200 – 300000, são amplamente utilizados como veículos em dispersões sólidas devido ao seu baixo ponto de fusão,

rápida velocidade de solidificação, habilidade de formar soluções sólidas, baixa toxicidade e baixo custo (BLEY, 2010). Os polímeros naturais são principalmente compostos pelos derivados de celulose, como a hidroxipropilmetilcelulose, HPMC, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, ou derivados de amido, como a ciclodextrinas (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). Historicamente, polímeros hidrofílicos de alto peso molecular, como as polivinilpirrolidonas, têm sido amplamente utilizadas em dispersões sólidas. O alto peso molecular desses polímeros, como o PVP k-30, favorece a formação de soluções sólidas (SETHIA; SQUILLANTE, 2004).

Figura 05. Estrutura química do polietilenoglicol

A terceira geração de dispersões sólidas envolve o emprego de tensoativos, acarretando melhora pronunciada do perfil de dissolução de fármacos com limitada solubilidade aquosa, o que aumenta sensivelmente a biodisponibilidade. Uma estratégia recorrente em muitas pesquisas envolvendo dispersões sólidas é o emprego de polímeros hidrofílicos juntamente com tensoativo, por exemplo, polietilenoglicol e polissorbato 80 (DANNENFELSER et al., 2004). Uma vantagem do emprego de tensoativos, como carreadores, é o fato destes estabilizarem as dispersões sólidas, evitando a recristalização do fármaco (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

O Poloxamer 407, copolímero de bloco de polioxietileno polioxipropileno, tem propriedades tensoativas e tem sido estudado em dispersões sólidas, acarretando aumento do perfil de dissolução de diversos fármacos (AHUJA; KATARE, SINGH, 2007; GODDERIS et al., 2008; NEWA et al., 2007; CHEN et al., 2004; NEPAL et al., 2010; ALI et al., 2010). Ainda, para alguns fármacos, o aumento de solubilidade utilizando poloxamers foi maior que o observado para outros polímeros, como os polietilenoglicóis (CHUTIMAWORAPAN et al., 2000).

Figura 06. Estrutura química do poloxamer

Outros carreadores com propriedades tensoativas frequentemente empregados em dispersões sólidas são os Gelucires, misturas de lipídeos, portanto sem estrutura química definida, que pertencem a uma família de veículos derivados de misturas de ésteres mono-, di- e triglicerídios de ácidos graxos e polietilenoglicol. Gelucires com diferentes propriedades estão disponíveis, incluindo valores de EHL (1 – 18) e pontos de fusão (33 °C – 70°C) (KARATAS; YUKSEL; BAYKARA, 2005). Gelucires tem sido utilizados com sucesso como carreadores em dispersões sólidas de indometacina (EL-BADRI; FETIH; FATH, 2009), nifedipina (VIPAGUNTA et al., 2002), glibenclamida (CHAUHAN; SHIMPI; PARADKAR, 2005) e diclofenaco (FINI et al., 2005).

Os dois principais métodos de preparo de dispersões sólidas são a fusão e evaporação do solvente. No método da fusão, o ativo e o carreador são fundidos juntos, seguido por resfriamento e pulverização do produto (SEKIGUCHI et al., 1961). Contudo, este método pode ter aplicação limitada em função das altas temperaturas empregadas no processo, o que pode causar degradação do ativo (SERAJUDDIN, 1999). Os processos que empregam este método são a simples fusão do carreador e fármaco em recipiente adequado utilizando uma chapa aquecida e evoluções deste método, como a extrusão em *hot stage*, método patenteado Meltrex[®], no qual se utiliza um extrusor de rosca especial e dois funis independentes, em uma ampla faixa de temperatura e o método da aglomeração, empregando o equipamento *High Shear Mixer*. O método da evaporação do solvente consiste na solubilização, ou suspensão, do fármaco e carreador em solvente orgânico, como etanol, clorofórmio, ou mistura de diclorometano e etanol, seguido por evaporação do solvente. Diferentes processos podem ser utilizados para a

evaporação do solvente, podendo-se citar a secagem a vácuo, aquecimento em placa aquecida, evaporação lenta à baixa temperatura, uso de rotaevaporador, spray-drying, freeze-drying e extração com fluidos supercríticos. As desvantagens deste método incluem o uso de solventes orgânicos, o alto custo de preparação e dificuldades na remoção completa dos solventes (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA; 2007).

Há outras técnicas para melhorar a biodisponibilidade de uma molécula pelo aumento de sua solubilidade além das estratégias oferecidas pela farmacotécnica, como, por exemplo, o emprego de modificações químicas na molécula. No caso da abordagem química, a estratégia pode ser a formação de um sal mais solúvel ou a introdução de grupamentos polares ou ionizáveis na molécula. Todavia, a estratégia de dispersão sólida é considerada menos dispendiosa, já que seu processo é mais simples e aplicável, além do fato de modificações químicas na molécula exigirem novos testes clínicos (SERAJUDDIN, 1999). Outra possibilidade, além das citadas, incluem a redução de tamanho de partícula e a solubilização micelar. A redução do tamanho de partícula aumenta a área superficial da molécula, e por isso sua solubilidade, através técnica de micronização. Desta maneira, o tamanho de partícula alcançado é muito pequeno, entre 2-5 µm, podendo resultar em pó com problemas de fluxo e com alta adesão. No caso do emprego da solubilização micelar, o produto obtido é líquido, podendo não ser tão conveniente para a administração, comparado a um sólido (KARAVAS et al., 2006).

Figura 07. Fases da pesquisa em dispersões sólidas (adaptado de VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

1.6 Caracterização físico-química

1.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos principalmente para avaliar e quantificar o ácido ursólico em plantas (LI et al., 2011; KONTOGIANI et al., 2009). Todavia, estes métodos envolvem etapas de extração na matriz vegetal, e não seriam adequados para a análise em matrizes menos complexas, como as formas farmacêuticas. Diante disto, o desenvolvimento de um método analítico adequado para determinar o ácido ursólico em formas farmacêuticas, como dispersões sólidas, é bastante relevante.

O desenvolvimento de um método analítico implica na necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos assim como sua eficiência na rotina do laboratório. A validação do método é um processo contínuo que visa confirmar a confiabilidade e capacidade de desempenho do mesmo (RIBANI et al., 2004; BRITO et al., 2003). Técnicas de separação como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) têm destaque na química analítica pela capacidade de identificação de compostos por comparação com padrões, purificação de compostos separando os de componentes de uma mistura seja ela biológica, farmacêutica ou alimentícia (RIBANI et al., 2004). Particularmente a CLAE é largamente empregada por possuir vantagens como: (i) curto tempo de preparo da amostra a ser analisada; (ii) dados qualitativos e quantitativos podem ser obtidos para amostras de polaridades variadas em uma só corrida de análise e (iii) permite várias formas de detecção podendo aumentar a especificidade e conteúdo de informações por ensaio (KARCHER et al., 2005).

1.6.2 Espectroscopia do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro do infravermelho é classificado em infravermelho próximo, na região de $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$; infravermelho médio, na região de $4000-200 \text{ cm}^{-1}$ e infravermelho distante na faixa de $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$. A absorção das bandas presentes na região do infravermelho está relacionada às vibrações fundamentais dos grupamentos químicos das moléculas, tais como -CH, -NH e -OH. Os espectros de infravermelho são representados de modo que a porcentagem de transmitância aparece como uma função do número de onda, que é o inverso do comprimento de onda (REICH, 2005)

A aplicação da radiação no espectro do infravermelho é bastante útil para obter informações sobre a estrutura e as propriedades das moléculas (TERPUGOV; DEGTYAREVA, 2001), já que auxilia no estudo da natureza das interações moleculares entre o fármaco e o carreador em dispersões sólidas, através da observação de quaisquer mudanças nos picos das bandas de absorção dos grupos funcionais das moléculas (VERHEYEN et al., 2002).

1.6.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial pertence ao grupo das análises térmicas, que são um conjunto de técnicas em que as propriedades físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação são medidos em função de um programa com temperatura controlada (WENDHAUSEN, 2005).

O princípio do DSC convencional é que o material é aquecido, resfriado ou mantido isotermicamente e transições ou eventos energéticos são investigados em função do tempo ou temperatura, com relação a um material de referência. Através desta técnica, informações como ocorrência de polimorfismo de fármacos, nível de amorficidade de materiais e temperatura de transição vítrea de polímeros amorfos podem ser determinadas. Esta técnica também é largamente empregada na

investigação de interações entre fármacos e excipientes em estudos de pré-formulação (FORD; MANN, 2012).

Esta técnica possui importante aplicação na caracterização de dispersões sólidas, auxiliando na investigação de interações intermoleculares e também na amorfização do fármaco. Em termos de interpretação dessas interações, basicamente as propriedades térmicas de uma mistura física são a soma dos componentes individuais, enquanto que em dispersões sólidas pode haver mudança ou desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e/ou variações na entalpia, significando algum tipo de interação entre fármaco e carreador (MAULVI et al., 2011).

1.6.4 Microscopia em *hot stage* (HSM)

A termoptometria é o termo empregado para descrever uma família de técnicas termoanalíticas nas quais uma propriedade ótica da amostra é monitorada versus o tempo ou temperatura programada. Os exemplos de termoptometria são a termomicroscopia (ou microscopia em *hot stage*), na qual a amostra é observada em microscópio, e a termoluminescência, na qual a luz emitida pela amostra é monitorada durante o experimento (HILL, 1991).

A microscopia em *hot stage* é uma técnica analítica que combina as propriedades da microscopia e das análises térmicas, permitindo a caracterização das propriedades físicas de materiais em função da temperatura. Esta técnica auxilia a caracterização de diversos materiais, complementando os resultados obtidos por técnicas como a calorimetria exploratória diferencial (VITEZ et al., 1999).

1.6.5 Difratometria de raios-X (DRX)

Os raios-X são gerados quando uma partícula de alta energia cinética, um elétron, gerado no cátodo de um tubo catódico, colide com um alvo metálico (ânodo).

Materiais cristalinos possuem a propriedade de difratar os raios-X de maneira característica, dependendo de seu arranjo cristalino (DONG; BOYD, 2011).

A difratometria de raios-X é uma técnica imprescindível na caracterização de dispersões sólidas, pois revela o estado cristalino e eventos de polimorfismo que o fármaco pode apresentar durante o processamento. O polimorfismo representa a propensão de um fármaco em existir como duas ou mais fases cristalinas que possuem diferentes arranjos moleculares no cristal, podendo ter impacto significativo nas propriedades farmacêuticas, tais como solubilidade, dissolução e densidade, o que em conjunto pode influenciar a biodisponibilidade. Outro emprego da técnica de difração de raios-X é a determinação do grau de cristalinidade de uma amostra, que pode ser alterado com o processamento das dispersões sólidas (DONG; BOYD, 2011). A conversão do fármaco do estado cristalino para o estado amorfo, que é desejável em dispersões sólidas, pode ser evidenciada através desta técnica.

1.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O uso desta técnica fornece informações em detalhe da superfície e morfologia de estruturas, com aumentos de até 300.000 vezes. A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons no material, sob condições de vácuo. A incidência do feixe de elétrons promove a emissão de elétrons secundários. A imagem eletrônica de varredura representa em tons de cinza o mapeamento e a contagem de elétrons emitidos pelo material analisado (DUARTE et al., 2003).

A técnica permite resoluções extremamente altas de até poucos nanômetros e possui um campo de visualização bastante flexível, o que a torna bastante útil. Este tipo de microscopia também permite uma maior ampliação e profundidade de foco comparado à microscopia ótica e é adequada para tamanhos de partícula de 0.1–1000 μm (SHUR; PRICE, 2012).

1.7 Avaliação

1.7.1 Solubilidade

A solubilidade de um soluto é a máxima quantidade deste que pode ser dissolvido em certa quantidade de solvente ou solução a uma temperatura especificada. A solubilidade influencia a eficácia terapêutica de um fármaco, pela influência desta na biodisponibilidade. Deste modo, a solubilidade é um dos parâmetros mais importantes para se alcançar a concentração desejada do fármaco na circulação sistêmica para que a resposta farmacológica seja atingida. Outro agravante é que compostos com baixa solubilidade frequentemente apresentam baixa molhabilidade. Quando adicionados ao solvente aquoso, os compostos geralmente flutam na superfície da solução, com mínima superfície de contato, levando a uma taxa muito baixa de dissolução (AVDEEF, 2007; JAMES, 1986).

Diversos fatores influenciam a solubilidade, dentre os quais podem ser mencionados o solvente, o pH, a temperatura, o tamanho de partícula, a polaridade do soluto e solvente, polimorfos e o fármaco no estado amorfo. Particularmente, para as dispersões sólidas, o aumento de solubilidade pode acontecer em decorrência da redução do tamanho de partícula e conversão do fármaco para o estado amorfo (JAMES, 1986; VASCONCELLOS; SARMENTO; COSTA; 2007).

Na pesquisa de dispersões sólidas, uma técnica frequentemente empregada é a determinação da solubilidade com as próprias formulações, onde se adiciona quantidade equivalente a um excesso de fármaco em água destilada ou outro solvente e se mantém a agitação por longos períodos com temperatura controlada (BABU; PRASA; MURPHY, 2002; MARIN; MARGARIT; SALCEDO, 2002).

1.7.2 Perfil de dissolução

Os testes de perfil de dissolução se tornaram oficiais na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) na década de 60 para avaliar o perfil de liberação de fármacos em formas farmacêuticas e definir a qualidade destas, servindo como preditivo da velocidade de absorção. Até então, somente os estudos de desintegração eram utilizados oficialmente como método *in vitro* de prever o desempenho do produto, até que o avanço nos estudos de sistemas de liberação de fármacos e a maior ênfase dada nos últimos anos na previsibilidade *in vitro* da ação terapêutica popularizaram e deram destaque aos estudos de dissolução. Inicialmente, os estudos de dissolução eram empregados para fármacos pouco solúveis em meio aquoso, contudo, atualmente, enfatiza-se a adoção do teste para as formas farmacêuticas para uso oral, com poucas exceções, por exemplo, fármacos que não são absorvidos (ZAHIRUL; KHAN, 1996).

A partir da equação modificada de Noyes-Whitney, os fatores importantes que influenciam a dissolução do fármaco podem ser identificados:

$$TD = dX/dt = AD(Cs-C)/h \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, dc/dt representa a taxa de dissolução, A representa a área disponível para a dissolução, D o coeficiente de difusão, C_s a solubilidade do composto no meio de dissolução, C a concentração do fármaco no meio de dissolução, e h a espessura da camada de difusão. Os fatores que podem afetar o parâmetro C_s são o polimorfismo que o fármaco possa apresentar, a presença de tensoativos no meio de dissolução, o PK_a do fármaco e o pH variável do trato gastrointestinal. Os fatores que podem afetar a área disponível para a dissolução são o tamanho de partícula do fármaco e a molhabilidade do fármaco (HORTER; DRESSMAN, 2001).

1.7.3 Citotoxicidade

Nos últimos anos, tem-se pesquisado o desenvolvimento e avaliação de estudos *in vitro* como *screening* para testes toxicológicos no lugar dos estudos de DL₅₀. Utilizando estes estudos, correlações significativas foram obtidas entre citotoxicidade e letalidade animal. A explicação para o emprego destes testes é que a previsão do potencial letal agudo é uma extensão da proposta de que a ação de um composto tóxico para produzir doença e morte são em última instância exercidos no nível celular. Neste sentido, a citotoxicidade é a expressão dos efeitos adversos na estrutura ou função de um ou mais componentes celulares, e tem sido sugerido que muitos compostos químicos exercem seus efeitos tóxicos interferindo com as estruturas ou funções celulares que são comuns a todos os tecidos e/ou por afetar estruturas e funções celulares de tecidos específicos (GARLE; FENTEM; FRYS, 1994).

Um dos ensaios mais empregados para a determinação da viabilidade celular é o teste do MTT(brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), um sal de tetrazólio azul solúvel em água. Este corante é convertido ao cristal roxo de formazan, insolúvel em água, através de uma clivagem redutiva do anel tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Dessa maneira, a quantidade de formazan formado pode ser determinada espectrofotometricamente e serve como estimativa do número de mitocôndrias e, portanto, do número de células vivas na amostra. O ensaio do MTT já foi empregado em muitos estudos, onde foi relatada a viabilidade de muitas linhagens celulares diferentes (AZIZ, 2005).

1.7.4 Atividade tripanocida

O *T. cruzi* é capaz de infectar um grande número de espécies de mamíferos, incluindo muitos dos animais comuns de laboratório, o que permite o emprego de modelos animais para o estudo doença de Chagas. O camundongo mimetiza a fase aguda característica da doença, com abundância de formas circulantes e teciduais,

assim como elevados índices de mortalidade. Além disso, este animal é interessante como modelo para a doença de Chagas em função de seu pequeno porte, facilidade de obtenção e manutenção, suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* e necessidade de menor quantidade de substância para o tratamento (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

A atividade tripanocida do ácido ursólico empregando modelo animal foi demonstrada em alguns trabalhos. CUNHA et al. (2006) reportou uma redução significativa de parasitas no pico parasitêmico, utilizando tratamento intraperitoneal em animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* com 2 mg/Kg/dia de ácido ursólico. Em outro trabalho, FERREIRA et al. (2010) demonstrou que o tratamento oral com 20 mg/Kg/dia deste fármaco é capaz de promover uma diminuição similar da parasitemia. Todavia, estes autores relataram que a baixa solubilidade do fármaco é um fator limitante da eficácia deste fármaco, o que incentiva o desenvolvimento de um produto farmacêutico que possa contornar este problema.

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é o aumento da solubilidade e velocidade de dissolução do ácido ursólico através da técnica de dispersão sólida com polímeros hidrofílicos, visando ao aumento da biodisponibilidade do fármaco e a potencialização de sua atividade tripanocida.

2.2 Objetivos específicos

- Comparação de dispersões sólidas e misturas físicas manipuladas com os carreadores Polietilenoglicol 6000, Poloxamer 407, Gelucire 50/13 e caprato de sódio;
- Comparação das técnicas de preparo de dispersões sólidas, fusão e evaporação do solvente;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para avaliar o teor de ácido ursólico nas formulações desenvolvidas;
- Avaliação das propriedades do estado sólido dos produtos desenvolvidos, empregando as técnicas analíticas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia do infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, microscopia em *hot stage* e difração de raios-X;
- Avaliação da solubilidade aquosa e perfil de dissolução *in vitro* do fármaco em misturas físicas e dispersões sólidas;
- Avaliação da citotoxicidade das formulações desenvolvidas em linhagem celular LLC-MK2;
- Avaliação da atividade tripanocida do ácido ursólico em dispersões sólidas, empregando modelo animal para a doença de Chagas.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Substâncias químicas

- Acetonitrila, grau HPLC – J.T.Baker;
- Ácido clorídrico P.A. – Synth;
- Ácido ursólico – Idealfarma;
- Água MilliQ (filtro Gradient – Millipore);
- Álcool isopropílico P.A. – J.T.Baker;
- Brometo de potássio – Sigma
- Caprato de sódio – Sigma;
- Dióxido de sílicio coloidal (Aerosil 200) – Synth;
- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. – Synth;
- Gelucire 50/13 – Gattefosse;
- Hidróxido de sódio P.A. – Synth;
- Lauril sulfato de sódio – Henrifarma;
- Polietilenoglicol 6000 – Sigma;
- Poloxamer 407 – Basf;
- Metanol, grau HPLC – J.T.Baker.

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos – MS1 minishaker, IKA;
- Agitador magnético – Lab disk, IKA;
- Agitador magnético – MAG MULTI, Marte;
- Balança analítica – Adventurer™, Ohaus;
- Balança semi-analítica – AS 2000C, Marte;
- Banho-Maria – Q 335D, Quimis;

- Calorímetro diferencial de varredura – DSC-50, Shimadzu;
- Câmera acoplada ao microscópio óptico – Axiocam HRC, Zeiss;
- Coluna C18 Lichrospher®, Merk;
- Cromatógrafo a líquido constituído por uma bomba modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10AVP injetor Rheodyne e integrador Chromatopac modelo C-R6A, Shimadzu;
- Difractômetro de raios-X – DS005, Siemens;
- Dissolutor – SR8 Plus, Hanson Corporation;
- Espectrofotômetro de FTIR – IRPrestige-21, Shimadzu;
- Espectrofotômetro com leitor de microplacas;
- Filtros de 0,45 µm de celulose regenerada - Millipore®
- Medidor de pH – DM 20, Digimed;
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 20 a 200 µL, 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL – Finnpiette;
- Microscópio óptico – Axioplan 2 Image, Zeiss;
- Suporte de aquecimento – TMSSG 600, Linkam.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação das dispersões sólidas e misturas físicas

As dispersões sólidas com PEG, POL e GEL foram preparadas com fármaco e polímero nas razões de 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20, (p/p). Os produtos contendo Gelucire 50/13, também foram preparados nestas proporções, mas tiveram o acréscimo de 20% (p/p) de dióxido de silício, empregado para tornar sólida pulverizável a massa formada pelo polímero, seguindo a proposta de CHAUHAN et al., 2005. No método da fusão, empregou-se com modificações o método proposto por PAPAGERGIU et al., 2006. Em resumo, o fármaco foi adicionado ao polímero fundido a 200°C, com contínua homogeneização. O produto foi deixado solidificar à temperatura ambiente e então pulverizado com grau e pistilo. No método do solvente, seguiu-se o método

proposto por MARIN; MARGARIT; SALCEDO, 2002. Para tanto, o fármaco e carreador foram solubilizados em metanol (10%, p/v), seguido por evaporação do solvente à temperatura ambiente em capela de fluxo, submetido à agitação. Após evaporação do solvente, o produto foi acondicionado em estufa a 40°C por 24h para evaporação do solvente residual e em seguida por pulverizado com grau e pistilo. Em outro estudo, foram preparadas dispersões sólidas contendo Poloxamer 407: CAP: AU nas razões de 8:1:1, 7:2:1 e 4,5:4,5:1 (p/p), pelo método do solvente. As misturas físicas foram preparadas pela homogeneização em saco plástico dos constituintes previamente triturados. Antes do armazenamento em dessecador, todas as amostras foram tamisadas em malha 28 mesh.

As formulações desenvolvidas com os diferentes polímeros, empregando os métodos de preparo por evaporação do solvente, fusão, ou mistura física, com proporções variáveis de fármaco, estão relacionadas aos seus respectivos códigos na Tabela 01.

Tabela 01. Código das formulações desenvolvidas com diferentes carreadores, métodos de preparo e porcentagem de fármaco.

Carreador	Método de preparo	Fármaco (% p/p)	Código
PEG	Evaporação do solvente	50	PEG DSS001
PEG	Evaporação do solvente	20	PEG DSS002
PEG	Evaporação do solvente	10	PEG DSS003
PEG	Evaporação do solvente	5	PEG DSS004
PEG	Fusão	50	PEG DSF001
PEG	Fusão	20	PEG DSF002
PEG	Fusão	10	PEG DSF003
PEG	Fusão	5	PEG DSF004
PEG	Mistura física	50	PEG MF001
PEG	Mistura física	20	PEG MF002
PEG	Mistura física	10	PEG MF003
PEG	Mistura física	5	PEG MF004
GEL	Evaporação do solvente	50	GEL DSS001
GEL	Evaporação do solvente	20	GEL DSS002
GEL	Evaporação do solvente	10	GEL DSS003
GEL	Evaporação do solvente	5	GEL DS004
GEL	Fusão	50	GEL DSF001
GEL	Fusão	20	GEL DSF002
GEL	Fusão	10	GEL DSF003
GEL	Fusão	5	GEL DSF004
GEL	Mistura física	50	GEL MF001
GEL	Mistura física	20	GEL MF002
GEL	Mistura física	10	GEL MF003
GEL	Mistura física	5	GEL MF004
POL	Evaporação do solvente	50	POL DSS001
POL	Evaporação do solvente	20	POL DSS002
POL	Evaporação do solvente	10	POL DSS003
POL	Evaporação do solvente	5	POL DSS004
POL	Fusão	50	POL DSF001
POL	Fusão	20	POL DSF002
POL	Fusão	10	POL DSF003
POL	Fusão	5	POL DSF004
POL	Mistura física	50	POL MF001
POL	Mistura física	20	POL MF002
POL	Mistura física	10	POL MF003
POL	Mistura física	5	POL MF004
POL/CAP (9:1)	Evaporação do solvente	10	CAP DSS001
POL/CAP (8:2)	Evaporação do solvente	10	CAP DSS002
POL/CAP (1:1)	Evaporação do solvente	10	CAP DSS003
POL/CAP (9:1)	Mistura física	10	CAP MF001
POL/CAP (8:2)	Mistura física	10	CAP MF002
POL/CAP (1:1)	Mistura física	10	CAP MF003

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia superficial do fármaco, polímeros, misturas físicas e dispersões sólidas foi examinada usando microscópio eletrônico de varredura Zeiss® EVO 50 (Alemanha). Os pós foram fixados em porta amostra empregando fita adesiva de carbono e em seguidas tornados eletricamente condutores por revestimento com ouro em equipamento SCD 050 Bal-Tec Sputter Coater (Alemanha). A voltagem variou de 10 a 25 kV durante a varredura.

3.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os experimentos foram realizados com o uso de equipamento Shimadzu IRPrestige-21. As amostras foram previamente homogeneizadas e compactadas com brometo de potássio em prensa hidráulica. As análises foram feitas com resolução de 2 cm^{-1} , de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises foram executadas em equipamento Shimadzu DSC-50. As amostras foram pesadas (5mg) e aquecidas de 30 a 330°C , com velocidade de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A calibração do equipamento foi realizada usando indium e n-octadecane, como materiais de referência. Os dados foram manipulados usando o software Shimadzu TA60.

3.2.5 Microscopia em *Hot Stage*

As análises foram realizadas utilizando o suporte de aquecimento TMSSG 600 (Linkam), acoplado ao microscópio Axioplan 2 Image (Zeiss), equipado com a câmera Axiocam HRC (Zeiss). Uma pequena quantidade de amostra (2-4 mg) foi posicionada entre uma lâmina e lamínula de vidro e aquecidas a 10°C/min. Alterações na morfologia das amostras foram fotografadas em função da temperatura.

3.2.6 Difração de Raios-X

As medidas de difração de raios-X foram executadas no equipamento Siemens/D5005, com ânodo de cobre operado com radiação de CuK (1.5406 Å, 40kV e 30mA). Os espectros de raios-X foram obtidos na escala de 2θ , entre 2° a 50°, com incremento de 0.05°/s.

3.2.7 Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu (Japão) constituído por uma bomba modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10AVP ($\lambda = 203$ nm), injetor Rheodyne, e integrador Chromatopac modelo C-R6A. A fase estacionária foi composta por uma coluna C18 Lichrospher® Merk (d.i. 4,0 x 250 mm; 5 μ m), protegida por uma coluna de guarda (d.i. 4x4 mm) de mesma composição. A fase móvel foi constituída de acetonitrila : água (88 : 12, v/v). As análises foram realizadas em temperatura ambiente controlada (25,0 $\pm$ 1,0°C) utilizando uma vazão 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção 20 μ L. As amostras foram filtradas em membrana 0,45 μ m antes da injeção (ELOY et al., 2012).

3.2.8 Validação do método analítico

Para validação do método foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, seguindo as especificações da ANVISA e recomendações do ICH Harmonised Tripartite Guideline.

3.2.8.1 Seletividade

A seletividade foi determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras do ácido ursólico acrescidas de quantidades apropriadas dos excipientes empregados nas dispersões sólidas e análise das dispersões sólidas sem o fármaco (placebos).

3.2.8.2 Linearidade

A partir da solução estoque de ácido ursólico ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas soluções em concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As curvas analíticas foram construídas relacionando os valores da concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$, no eixo das abscissas com os valores das áreas obtidas no eixo das ordenadas. O intervalo linear foi calculado através da verificação da proporcionalidade entre a concentração e a resposta a partir do cálculo do coeficiente linear (b), do coeficiente angular (a) e do coeficiente de correlação (r) (r mínimo aceitável foi de 0,99).

3.2.8.3 Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária. A exatidão foi avaliada intra e interensaio. Para avaliar estes parâmetros, foram utilizadas soluções de padrão de ácido ursólico (1,0; 25,0 e 50,0 µg mL⁻¹). Para a determinação da repetibilidade e da exatidão intraensaio, as análises de 10 replicatas foram realizadas em um mesmo dia, já a exatidão interensaios e precisão intermediária foram avaliadas em triplicata, por três dias consecutivos. Os resultados da precisão do método foram apresentados através do coeficiente de variação (CV), calculado pela razão do desvio padrão com a média dos valores obtidos.

Os resultados da precisão do método foram apresentados através do coeficiente de variação (CV) obtido pela Equação 2.

$$CV\% = \frac{s}{X} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: s = desvio padrão; X = média dos valores obtidos

Os resultados da exatidão intra e interensaios foram obtidos através da Equação 3.

$$E = \frac{\text{valor obtido} - \text{valorteórico}}{\text{valorteórico}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

3.2.8.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi determinado através do sinal / ruído da linha de base através da Equação 4

$$LD = DPa \times \frac{3}{IC} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: DPa = desvio padrão médio do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas padrão e IC = inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração obtida com precisão e exatidão.

3.2.9 Determinação do teor de ácido ursólico em formulações

Pesou-se amostra correspondente a 25 mg de fármaco, que foi solubilizada em 10 mL de acetonitrila e filtrada (0,45 µm). Para a análise, este volume foi diluído (1:10, v/v) em acetonitrila. As condições analíticas empregadas foram aquelas descritas no item 3.7. (n = 3)

3.2.10 Determinação da solubilidade

A solubilidade em água de ácido ursólico puro, nas misturas físicas ou dispersões sólidas foi determinada pela adição do excesso de fármaco (10 mg) em água deionizada seguido por agitação magnética (300 rpm) a 25°C por 24h. As amostras foram filtradas (0,45 µm), diluídas e analisadas por CLAE. (n=3). Para alguns casos, foi empregada a análise estatística pelo teste t de student ou Tukey.

3.2.11 Estudos de dissolução

O estudo de perfil de dissolução foi realizado com o uso do equipamento SR8 Plus Hanson Corporation (Chatsworth, CA, USA). A amostra (equivalente a 7,5mg de fármaco) foi incubada em 900 mL de tampão fosfato (pH 6.8) ou solução de HCl 0,1N, a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, e agitada a 75 rpm com pás. Para os experimentos com Gelucire, ao tampão fosfato acrescentou-se lauril sulfato de sódio (1%). Nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 120 min, 1 mL de alíquota foi retirada, filtrada e diluída (1:5, v/v). n=3.

3.2.12 Avaliação da citotoxicidade

As formulações foram avaliadas com relação à citotoxicidade em linhagens de fibroblastos do tipo LLC-MK2 através do método do MTT (FISICHELLA et al., 2009). Em resumo, as células LLC-MK2 (1×10^6 /mL) foram cultivadas em placas com 96 poços contendo os produtos a serem avaliados nas seguintes diluições: 8, 32, 256 e 500 μM . As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 24 horas. Depois deste período, 10 μL de álcool isopropílico foi adicionado, e a placa foi mantida a temperatura ambiente por 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

3.2.13 Ensaio biológico *in vivo*

Nos experimentos de atividade tripanocida *in vivo*, camundongos BALB/C pesando aproximadamente 25 g foram aleatoriamente divididos em grupos, contendo 5 animais cada. Estes animais foram infectados 48 horas antes da administração das formulações com aproximadamente 2×10^4 de formas

tripomastigotas da cepa Y por injeção intraperitoneal. Os grupos foram tratados diariamente com as formulações por tratamento oral efetuado na dose de 20mg/kg por 21 dias e o número de parasitas foi quantificado de acordo a técnica de contagem em microscópio óptico descrita por BRENER (1962). Os animais foram avaliados de acordo ao nível de infecção.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização

As misturas físicas e dispersões sólidas preparadas com PEG 6000 e Poloxamer 407, contendo 10% de fármaco (p/p) e as misturas físicas e dispersões sólidas preparadas com Gelucire 50/13, contendo 5 % de fármaco (p/p), foram caracterizadas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial, microscopia em *hot stage* e difratometria de raios-X. Estas formulações foram selecionadas para os estudos de caracterização em função do balanço favorável entre solubilidade e porcentagem carregada de fármaco, que será discutido oportunamente neste trabalho. A formulação preparada com Poloxamer 407 pelo método do solvente contendo 10% de fármaco e a respectiva mistura física foram selecionadas para o estudo de adição do tensoativo caprato de sódio. Para estas formulações, as técnicas de espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier e a difratometria de raios-X foram empregadas na caracterização físico-química.

4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica comumente empregada para caracterizar a morfologia e forma de partículas de dispersões sólidas. Esta análise é de grande utilidade, pois as características morfológicas das partículas têm importante relevância industrial, interferindo em processos como a compressibilidade do pó (FU et al., 2012). Sabe-se que para materiais plásticos, como os polietilenoglicóis, há um aumento da compressibilidade para partículas com formato irregular, já para os materiais que fragmentam a forma da partícula não influencia nesta característica (WONG; PILPEL, 1990).

O ácido ursólico é apresentado na Figura 08, onde se pode claramente observar sua estrutura cristalina. Quanto aos carregadores, o PEG 6000 apresenta

uma estrutura cristalina com superfície regular, mostrado na Figura 08, o Gelucire 50/13 apresenta-se como partículas com forma irregular e o dióxido de silício coloidal possui o formato de esferas, ambos apresentados na Figura 09. O Poloxamer 407 exibe estrutura esférica com superfície lisa e regular, evidenciado na Figura 10.

Observa-se que todas as misturas físicas correspondem à simples mistura dos componentes, que ainda podem ser visualizados separadamente, enquanto as dispersões sólidas preparadas com três polímeros, produzidas pelas duas técnicas de preparo estudadas, exibem formatos irregulares, com morfologias diferentes das matérias primas utilizadas no preparo. Nas dispersões sólidas, os cristais do fármaco não podem ser observados isoladamente, indicando que os mesmos encontram-se dispersos na matriz polimérica, o que é um dos indicativos de formação das dispersões sólidas.

Figura 08. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do fármaco, PEG 6000, PEGMF003, PEGDSS003 e PEGDSF003, obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Escala de 1 μ m para o fármaco e 10 μ m para as demais amostras.

Figura 09. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do fármaco, Gelucire 50/13, dióxido de silício coloidal, GELMF003, GELDSS003 e GELDSF003, obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Escala de 1 µm para o fármaco e 10 µm para as demais amostras.

Figura 10. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do fármaco, Poloxamer 407, POLMF003, POLDSS003 e POLDSF003, obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Escala de 1 µm para o fármaco e 10 µm para as demais amostras.

4.1.2 Espectroscopia do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise do espectro na região do infravermelho é empregada na caracterização das dispersões sólidas porque permite a identificação das moléculas presente no sistema e também possibilita a identificação de possíveis interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, que por ventura possam ocorrer entre as moléculas do fármaco e carreadores. Tais interações podem resultar em alargamento dos picos de absorção das funções químicas participantes da interação, como a hidroxila ou carbonila, bem como mudança na posição destes picos no espectro (VERHEYEN et al., 2002). Uma importante implicação deste tipo de interação em dispersões sólidas é o eventual aumento da solubilidade aquosa de fármacos lipossolúveis carreados por polímeros hidrofílicos (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

Na Figura 11, observa-se que o ácido ursólico apresenta uma banda estreita localizada em 1714 cm^{-1} , correspondente à vibração de deformação axial de ligação dupla do grupamento carbonila, presente na estrutura do fármaco. Dentre outras, destacam-se as bandas presentes em 3400 cm^{-1} , relativa ao estiramento da hidroxila do fármaco, além de moléculas de água adsorvidas no cristal, e a banda em 2900 cm^{-1} , pertencente à vibração de estiramento da ligação C-H. Na mesma figura, pode-se visualizar o espectro do PEG 6000, merecendo destaque as bandas ao redor de 3400 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} , correspondentes as vibrações de estiramento das ligações O-H, C-H e C-O, respectivamente.

Figura 11. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, polietilenoglicol 6000, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.

Na Figura 12, são apresentados os espectros do Gelucire 50/13 e também do dióxido de silício coloidal, empregados como carreadores em dispersões sólidas. O espectro do Gelucire 50/13, como demonstrado, também exibe um banda referente ao estiramento da carbonila, presente ao redor de 1700 cm^{-1} , além de apresentar as bandas presentes em 1100 e 3400 cm^{-1} , o que torna o espectro deste carreador semelhante ao do fármaco, com diferenças importantes nas bandas entre aproximadamente 700 e 1500 cm^{-1} . Já o SiO_2 exibe uma banda principal em 1000 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação $\text{S}=\text{O}$.

Figura 12. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, dióxido de silício, Gelucire 50/13, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.

O espectro de outro carreador empregado neste trabalho, o Poloxamer 407, é apresentado na Figura 13. Nesta figura, pode-se observar a semelhança com o espectro do PEG 6000, porque estes dois carreadores são constituídos basicamente pela repetição dos mesmos grupamentos químicos. Deste modo, as bandas que se destacam estão presentes em ao redor de 3400 cm⁻¹, 2900 cm⁻¹ e 1110 cm⁻¹, correspondentes as vibrações de estiramento das ligações O-H, C-H e C-O, respectivamente.

Figura 13. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, Poloxamer 407, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.

A partir das estruturas químicas do fármaco e dos adjuvantes PEG 6000, Gelucire 50/13 e Poloxamer 407, seriam esperadas interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila dos excipientes e carbonila do fármaco. As Figuras 11, 12 e 13 mostram que os espectros das misturas físicas equivalem a simples somatória entre os espectros do fármaco e adjuvantes, sem quaisquer interações aparentes, evidenciando que nenhuma interação química ocorreu, conforme esperado. A banda da carbonila presente nas misturas físicas tem tamanho menor que no espectro do ácido ursólico, em função do conteúdo reduzido de fármaco nos sistemas preparados.

No caso das dispersões sólidas, observa-se um alargamento e diminuição da banda de absorção da carbonila, o que é mais evidente para as dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente, o que pode sugerir a ocorrência de ligações de hidrogênio entre fármacos e carreadores. Para as dispersões sólidas preparadas

pelo método da fusão, nota-se que a ocorrência de interação intermolecular entre fármacos e carreadores foi menos pronunciada, pois a diminuição e alargamento da banda da carbonila foram menores comparados às dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente. Uma hipótese para explicar esta observação é que no método do solvente há uma maior mobilidade para fármaco interagir por ligações de hidrogênio com o carreador. Já no método da fusão, o líquido fundido é mais viscoso, que diminui a mobilidade e o contato entre os componentes, aliado ao menor tempo de preparo, o que em conjunto poderiam prejudicar a ocorrência de interações intermoleculares entre fármaco e carreador.

A ocorrência de ligações de hidrogênio entre fármacos e carreadores hidrofílicos já foi demonstrada em alguns trabalhos científicos. ALI, WILLIAMS e RAWLINSON, em 2010, mostraram que a hidroxila do Poloxamer 407 tem a propriedade de realizar ligações de hidrogênio com o fármaco ibuprofeno, observado através do alargamento da banda da carbonila do fármaco. Interações intermoleculares entre um fármaco lipofílico, etoricoxibe, e o carreador Gelucire 50/13 também já foram relatadas (CHAUHAN; SHIMPI; PARADKAR, 2005), o que foi associado com uma melhora do perfil de dissolução do fármaco.

A formulação preparada com Poloxamer 407 pelo método do solvente foi selecionada para a adição de diferentes quantidades do tensoativo caprato de sódio. Estas misturas físicas e dispersões sólidas também foram caracterizadas quanto à espectrofotometria do infravermelho, conforme apresentado na Figura 14. Observa-se que o caprato de sódio, um sal biliar, apresenta um importante pico de absorção, em torno de 1650 cm^{-1} , atribuído ao estiramento da carbonila do éster da molécula. Esta molécula não possui um grupamento hidroxílico que poderia realizar ligações de hidrogênio com a carbonila do fármaco, porém a carbonila do caprato de sódio poderia atuar como aceptora de prótons da hidroxila do ácido ursólico, o que permitira a interação intermolecular entre as duas moléculas. Nas formulações preparadas, observa-se que comparadas às misturas físicas, as dispersões sólidas apresentaram uma ligeira diminuição da intensidade do pico da carbonila do fármaco, localizado ao redor de 1700 cm^{-1} , o que poderia sugerir a interação entre o carbonila e a hidroxila do carreador, neste caso, o Poloxamer 407, que possui este grupamento químico.

Figura 14. Espectro de infravermelho de ácido ursólico, Poloxamer 407, caprato de sódio misturas físicas e dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente.

4.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 15 mostra um pico endotérmico em 283,05°C na curva de DSC do ácido ursólico, o que corresponde à temperatura de fusão do fármaco. Além deste, a

curva de DSC do ácido ursólico também apresenta um pico exotérmico em 192°C, atribuído a um evento de cristalização. Eventos de transições cristalinas, como o observado, são comuns, já que fusão e recristalização são eventos competitivos durante o processo de aquecimento e geralmente a recristalização torna o novo cristal formado mais estável do ponto de vista termodinâmico (YASUNIWA; TSUBAKIHARA; FUJIOKA, 2003).

As curvas de DSC dos carreadores empregados no preparo das misturas e dispersões sólidas, PEG 6000, Gelucire 50/13 e Poloxamer 407, estão representados nas Figuras 15, 16 e 17 e evidenciaram picos endotérmicos característicos da fusão de cada carreador em 65,27°C, 57,57°C e 38,59°C, respectivamente. Estas figuras ainda mostram as curvas de DSC para as misturas físicas e dispersões sólidas preparadas pelos métodos de fusão e evaporação do solvente, empregando os carreadores hidrofílicos em questão, são idênticas à dos polímeros, não sendo possível a identificação da endoterma de fusão do fármaco. O comportamento esperado seria a somatória entre a endoterma do fármaco e excipientes, considerando que o processo de preparo da mistura física geralmente não permite interações entre o fármaco e o carreador, porém o fármaco pode solubilizar-se total ou parcialmente no polímero fundido durante o aquecimento empregado no experimento da calorimetria exploratória diferencial, o que já foi relatado em alguns trabalhos (NEWA et al., 2007; CHAUHAN; SHIMP; PARADKAR, 2005).

Por outro lado, o desaparecimento da endoterma de fusão do fármaco em dispersões sólidas pode significar que o mesmo está presente como solução molecular, ou ainda, a molécula pode estar no estado amorfo, não apresentando um pico endotérmico de fusão, como já reportado na literatura (MAULVI et al., 2011; ALI; WILLIAMS; RAWLINSON, 2010; PATEL et al., 2010; BRISHE, 2011). Outras técnicas, como a microscopia em *hot stage* e a difratometria de raios-X podem elucidar como o fármaco encontra-se disperso no sistema, como partícula cristalina, amorfa, ou disperso molecularmente.

Figura 15. Curvas de DSC de ácido ursólico, polietilenoglicol 6000, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método da fusão e dispersão sólida preparada pelo método do solvente.

Figura 16. Curvas de DSC de ácido ursólico, Gelucire 50/13, dióxido de silício, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método da fusão e dispersão sólida preparada pelo método do solvente.

Figura 17. Curvas de DSC de ácido ursólico, Poloxamer 407, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método da fusão e dispersão sólida preparada pelo método do solvente.

4.1.4 Microscopia em *hot stage* (HSM)

As observações microscópicas em *hot stage* apresentadas na Figura 18 evidenciaram pequenas estruturas em forma de agulhas formando-se antes da fusão do ácido ursólico, em temperatura próxima a 200°C, o que comprova que o evento exotérmico observado nas análises de DSC corresponde a uma transição cristalina do fármaco. Nas análises de HSM, os cristais de ácido ursólico fundiram a aproximadamente 300°C, o que está de acordo ao pico endotérmico observado na curva de DSC.

Para todas as misturas físicas estudadas, observou-se inicialmente a fusão de cada polímero, restando aglomerados de fármaco que a aproximadamente 200°C sofreram o fenômeno da transição cristalina, antes da fusão a uma temperatura

próxima a 300°C. Estes resultados sugerem que o ácido ursólico manteve sua estrutura cristalina nas misturas físicas.

Para as dispersões sólidas o comportamento do ácido ursólico mostrou-se diferente das misturas físicas. No caso das dispersões sólidas preparadas pelo método da fusão, o comportamento foi diferente para cada um dos carreadores empregados, PEG 6000, Gelucire 50/13 e Poloxamer 407. Para o PEG 6000, a Figura 18 destacou a formação de cristais maiores que os da mistura física, de coloração azul e amarela. Cristais menores e diferentes dos formados pelo produto preparado com PEG 6000 também foram formados na dispersão sólida produzida pelo método da fusão com o Poloxamer 407, apresentado na Figura 20. O Gelucire 50/13, por outro lado, apresentou um comportamento diferente, já que não houve nenhuma transição cristalina, como representado na Figura 19. Estas observações em conjunto podem sugerir que o fármaco está presente em um estado polimórfico diferente nas dispersões sólidas, sofrendo por isso um comportamento diferente a 200°C, com uma transição cristalina diferente da mistura física, no caso do PEG 6000 e Poloxamer 407, ou a não ocorrência da transição cristalina, para o Gelucire 50/13. Considerando a importância que o polimorfismo possui no desenvolvimento e produção de medicamentos, especialmente em função da alteração das propriedades físico-químicas dos fármacos, o conhecimento e o controle das alterações polimórficas em um produto farmacêutico é de extrema relevância. Alterações como a observada já foram descritas na literatura por NAIMA e colaboradores que, em 2010, relataram o aparecimento de pequenos cristais em forma de agulha para a carbamazepina dispersa em PEG 6000, o que foi atribuído a uma conversão de uma forma polimórfica do fármaco a outra.

O comportamento das dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente foi diferente dos produtos preparados pelo método da fusão, já que a 200°C não houve qualquer transição cristalina. Esta observação pode ser um indicativo de que o fármaco nas dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente está disperso em um estado diferente da mistura física. Conforme discutido na revisão de literatura sobre dispersões sólidas por DHIRENDRA et al., (2009), o fármaco em dispersão sólida pode estar presente como partícula cristalina, amorfa, ou disperso no estado molecular. Como a análise por DSC mostrou que os polímeros carreadores das dispersões sólidas fundem em suas temperaturas características de

fusão, restando aglomerados de fármaco, visualizados por HSM, que fundem somente a 300°C, propõe-se que o ácido ursólico não está disperso nos sistemas desenvolvidos no estado molecular, e sim está suspenso no estado cristalino, ou amorfo, o que pode ser comprovado revelado pela difratometria de raios-X.

Figura 18. Fotomicrografias de *hot stage* do fármaco, carreador, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão, a temperatura ambiente (A) e a 200°C (B).

Figura 19. Fotomicrografias de *hot stage* do fármaco, carreador, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão, a temperatura ambiente (A) e a 200°C (B).

Figura 20. Fotomicrografias de *hot stage* do fármaco, carreador, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão, a temperatura ambiente (A) e a 200°C (B).

4.1.5 Difração de Raios-X

Com o intuito de analisar uma possível alteração na estrutura cristalina do ácido ursólico em decorrência da produção das dispersões sólidas, conforme sugerido pelas análises em HSM, e também avaliar o grau de cristalinidade das amostras (DONG; BOYD, 2011), os experimentos de difração de raios-X foram realizados.

A Figura 21 mostra o difratograma de raios X do ácido ursólico, no qual é possível confirmar sua estrutura cristalina, através dos vários picos de difração apresentados, estando os mais proeminentes presentes em 6°, 8° e 14°, destacados com flechas nas figuras. Com relação aos carreadores empregados nas formulações, PEG 6000, Gelucire 50/13 e Poloxamer 407, os picos de difração principais estão presentes em 19° e 23°, o que mostra que estes carreadores são materiais semi-cristalinos semelhantes entre si, apresentados nas Figuras 21, 22 e 23, respectivamente. Já o caprato de sódio, cujo difratograma está presente na Figura 24, exibe um pico cristalino principal, em torno de 2° no ângulo de 2 θ .

Os difratogramas das misturas físicas com PEG 6000, Gelucire 50/13, Poloxamer 407 e Poloxamer 407 acrescido de caprato de sódio apresentaram uma somatória dos picos característicos do fármaco, destacados com flechas, e os dos carreadores, mostrados nas Figuras 21, 22, 23 e 24, respectivamente. Deste modo, pode-se afirmar que o processamento das misturas físicas não alterou as propriedades cristalinas do ácido ursólico, demonstrado em conjunto pelas técnicas de FTIR, DSC, HSM e DRX, o que já foi observado para misturas físicas com outros fármacos, como valdecoxibe em PEG 4000 e PVP k-30 (SHAH et al., 2008). Como esperado, o pico do fármaco nas misturas físicas é menor comparado ao do fármaco puro, visto que as dispersões sólidas caracterizadas contêm somente 5% ou 10% (p/p) de fármaco.

Com relação às dispersões sólidas nota-se o desaparecimento ou diminuição dos picos cristalinos do fármaco, indicando a transição do estado cristalino para o estado amorfo, o que já foi relatado em outros trabalhos (CHAUHAN; SHIMP;

PARADKAR, 2005; MONEGHINI; ZINGONE; DE SORDI, 2009; KIM et al., 2006). Particularmente para a dispersão sólida preparada pelo método da fusão empregando Poloxamer 407 observaram-se dois picos diferentes dos picos do fármaco e carreador, em 9° e 16°, sinalizados com flechas na Figura 23. Estes novos picos formados podem representar um polimorfo do fármaco formado em decorrência do processamento pelo método da fusão, o que estaria de acordo à observação da transição cristalina diferente da mistura física, evidenciada nos experimentos de HSM.

Por último, os resultados de DRX presentes na Figura 24 provam que a adição de quantidades crescentes de caprato de sódio, 10, 20 e 50 (% p/p), ao Poloxamer 407 manteve o comportamento já observado de redução do grau de cristalinidade do ácido ursólico em dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente.

Figura 21. Difratoograma de raios-X do fármaco, PEG 6000, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.

Figura 22. Difratoograma de raios-X do fármaco, carreadores Gelucire 50/13 e dióxido de silício coloidal, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.

Figura 23. Difratoograma de raios-X do fármaco, Poloxamer 407, mistura física, dispersão sólida preparada pelo método do solvente e dispersão sólida preparada pelo método da fusão.

Figura 24. Difratoograma de raios-X do fármaco, carreadores Poloxamer 407 e caprato de sódio, misturas físicas (esquerda) e dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente (direita).

4.1.6 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico

O desenvolvimento do método analítico para a determinação do ácido ursólico iniciou-se com a definição do comprimento de onda a ser utilizado, através da varredura no espectro do ultravioleta, mostrando que o fármaco absorve fortemente em 203 nm, o mesmo utilizado em trabalho prévio (GNOATTO; SHENKEL; BASSANI, 2005). Além disso, investigou-se a composição mais adequada da fase móvel, comparando-se os sistemas compostos por metanol:água e acetonitrila:água em diferentes proporções (80:20, 85:15, 88:12 e 90:10, v/v). A fase móvel composta por acetonitrila:água (88:12, v/v) mostrou-se a mais adequada, apresentando pico bem resolvido e tempo de retenção de 11 minutos, como demonstrado na Figura 25.

A fase móvel contendo metanol, por outro lado, revelou-se menos apropriada para a análise, pois o fármaco apresentou maior tempo de retenção, devido à maior polaridade do metanol em relação à acetonitrila. Além disso, a estabilização da linha de base foi mais demorada comparada à fase móvel composta por acetonitrila e água, apresentando bastante ruído. Este fato pode ser explicado pela maior absorvância do metanol (205 nm) com relação à acetonitrila (190 nm), e ao baixo λ (203 nm) utilizado para as análises (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Ressalta-se a importância da seleção criteriosa da composição da fase móvel, pois idealmente deseja-se que a corrida analítica seja a mais breve possível, usando mínimas quantidades de solvente orgânico, com consequências diretas para a redução do custo das análises.

Figura 25. Cromatograma do ácido ursólico.

4.1.6.1 Validação do método analítico

4.1.6.1.1 Seletividade

A seletividade é considerada a primeira etapa da validação analítica, pois deve-se garantir que os componentes da formulação, como os excipientes, não interfiram na quantificação do fármaco (RIBANI et al., 2004). Os resultados obtidos pela análise das soluções de ácido ursólico em acetonitrila contaminados com os excipientes empregados nas dispersões sólidas, PEG 6000, Gelucire 50/13, Poloxamer 407 e caprato de sódio, e análise das dispersões sólidas sem fármaco mostraram que estes polímeros não afetaram a quantificação do fármaco, porque não exibiram picos cromatográficos coincidentes com tempo de retenção característico do ácido ursólico.

4.1.6.1.2 Linearidade

O método desenvolvido apresentou linearidade na faixa de, 1,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após o ajuste dos dados por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, os valores das áreas obtidas mostraram ser diretamente proporcionais à concentração de fármaco, no intervalo avaliado, [área = $13.300 \times \text{concentração } (\mu\text{g mL}^{-1}) + 272,25$], com $r = 0,9999$.

Figura 26. Curva analítica.

4.1.6.1.3 Precisão e Exatidão

Para a análise fidedigna do fármaco o método deve mostrar-se preciso, ou seja, apresentar pequena dispersão entre resultados de leitura de uma mesma concentração e exato, representado pelo grau de concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio, ou ensaios independentes, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005). Os resultados apresentados na Tabela 02 evidenciaram que o método é preciso para ambas as determinações, repetibilidade, cujo CV máximo foi de 3,39% para a menor concentração analisada, $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, e interensaio, onde o CV máximo correspondeu a 4,49% para o limite de quantificação inferior $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. A Tabela 03 mostra que o método desenvolvido é exato, já que os desvios com relação aos valores nominais mantiveram-se entre 0,28 e 13,04%, para um mesmo dia de análise, e entre -4,11 e 0,19%, para ensaios em dias diferentes.

Tabela 02. Precisão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico

Repetibilidade			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,0	25,0	50,0
n	10	10	10
CV(%)	3,39	0,70	1,16
Precisão Intermediária			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,0	25,0	50,0
n	3	3	3
CV (%)	4,49	1,14	1,39
Conc.: concentração; n: número de replicatas.			

Tabela 03. Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico

Exatidão Intraensaio			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00	25,00	50,00
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,03	24,69	50,14
n	10	10	10
E(%)	3,04	-1,23	0,28
Exatidão Interensaio			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00	25,00	50,00
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,96	24,68	50,10
n	3	3	3
E(%)	-4,11	-1,27	0,20
Conc.: concentração; n: número de replicatas.			

4.1.6.1.4 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de quantificação, equivalente ao menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis, correspondeu a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Concentrações abaixo desta foram analisadas e excluídas por não apresentarem exatidão. O limite de detecção foi de $0,34 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.1.6.2 Determinação do teor de ácido ursólico em formulações

Os dados apresentados na Tabela 04 revelam que o teor do ácido ursólico a partir das formulações situou-se em intervalos compreendidos entre 81,73% e 109,33% do fármaco adicionado, o que forneceu evidência da seletividade do método, já que os adjuvantes da formulação não interferiram na análise. Além disso, pode-se concluir que os métodos de manufatura das dispersões sólidas não acarretaram em grandes perdas do fármaco.

Tabela 04. Teor de ácido ursólico em formulações.

Formulação	Teor (%)
PEG DSS001	89,58 ± 5,87
PEG DSS002	105,85 ± 2,69
PEG DSS003	83,58 ± 5,89
PEG DSS004	102,85 ± 4,25
PEG DSF001	91,64 ± 7,35
PEG DSF002	85,56 ± 9,69
PEG DSF003	85,69 ± 3,59
PEG DSF004	82,93 ± 0,33
PEG MF001	107,36 ± 7,39
PEG MF002	85,95 ± 6,05
PEG MF003	109,26 ± 1,31
PEG MF004	105,74 ± 8,65
GEL DSS001	89,79 ± 4,89
GEL DSS002	90,18 ± 5,86
GEL DSS003	104,56 ± 10,45
GEL DS004	105,03 ± 11,50
GEL DSF001	100,01 ± 3,50
GEL DSF002	94,71 ± 23,67
GEL DSF003	94,72 ± 23,67
GEL DSF004	106,84 ± 6,02
GEL MF001	109,33 ± 2,98
GEL MF002	88,79 ± 9,74
GEL MF003	90,25 ± 5,58
GEL MF004	107,32 ± 6,74
POL DSS001	81,73 ± 4,08
POL DSS002	106,43 ± 6,85
POL DSS003	99,83 ± 2,57
POL DSS004	105,84 ± 0,87
POL DSF001	88,65 ± 4,58
POL DSF002	89,48 ± 2,32
POL DSF003	84,88 ± 1,35
POL DSF004	96,57 ± 7,85
POL MF001	94,26 ± 3,00
POL MF002	98,79 ± 20,54
POL MF003	84,32 ± 3,92
POL MF004	88,33 ± 1,68
CAP DSS001	91,07 ± 3,34
CAP DSS002	92,95 ± 0,29
CAP DSS003	101,82 ± 0,23
CAP MF001	88,31 ± 1,29
CAP MF002	95,72 ± 2,55
CAP MF003	100,78 ± 5,52

4.2 Avaliação

4.2.1 Solubilidade

As misturas físicas e dispersões sólidas preparadas com o carreador PEG 6000 foram avaliadas com relação à solubilidade aquosa, cujos resultados estão representados graficamente na Figura 27, revelando que somente a formulação preparada pelo método do solvente provocou um aumento de solubilidade quantificável do fármaco. Notou-se que proporções crescentes de carreadores forneceram valores de solubilidade aquosa mais altos, equivalendo a 2,46, 4,59, 8,15 e 8,21 $\mu\text{g/mL}$ para as dispersões preparadas com 50, 80, 90 e 95% (p/p) de carreador, respectivamente. A comparação entre os dois últimos valores de solubilidade, de acordo ao teste t de student com $p < 0.05$, que compara dois grupos, mostrou que não há diferença estatística entre eles.

Figura 27. Solubilidade do ácido ursólico em dispersões sólidas preparadas com diferentes proporções de carreador PEG 6000.

A Figura 28 mostra o gráfico dos resultados de solubilidade aquosa do ácido ursólico em misturas físicas e dispersões sólidas preparadas com Gelucire 50/13 e dióxido de silício coloidal. Os resultados deixam claro que a solubilidade do fármaco foi maior em dispersões sólidas que em misturas físicas, para todas as proporções de carreador. Além disso, observam-se valores de solubilidade do fármaco maiores para sistemas preparados com proporções maiores de carreador, chegando este valor a 293,45 µg/mL, trinta e seis vezes maior que o que o maior valor de solubilidade do ácido ursólico alcançado para o carreador PEG 6000.

Os resultados também provam que o método do solvente foi mais eficiente para o aumento da solubilidade aquosa do fármaco, o que pode ser explicado pela conversão do fármaco do estado cristalino para o amorfo, que não possui retículo cristalino para ser quebrado durante o processo de solubilização, sendo portanto energeticamente mais favorável (TAYLOR; SOGRAFI, 1997). Além disso, a ocorrência de ligações de hidrogênio entre o fármaco lipofílico e o carreador hidrofílico evidenciadas por FTIR contribuem positivamente para o aumento de solubilidade (VERHEYEN et al., 2002). Ressalta-se que tanto a amorfização do fármaco quanto a ocorrência de interações intermoleculares entre fármaco e carreador foram mais pronunciadas para os sistemas preparados pelo método do solvente.

Os valores de solubilidade das dispersões com 5% de fármaco foram consideravelmente mais altos do que as preparadas com concentrações mais elevadas do ácido ursólico e por este motivo as primeiras foram selecionados para os estudos de caracterização físico-química.

Figura 28. Solubilidade do ácido ursólico em misturas físicas, dispersões sólidas preparadas pelo método da fusão e do solvente, com diferentes proporções de carreadores Gelucire 50/13 e dióxido de silício coloidal.

Os resultados de solubilidade aquosa do fármaco nas formulações preparadas com Poloxamer 407 estão representados graficamente na Figura 29. Neste gráfico, pode-se perceber que o comportamento de solubilidade do ácido ursólico é semelhante ao observado com o carreador Gelucire 50/13, com maiores valores de solubilidade para as dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente, seguido pelo método da fusão, seguido das misturas físicas. Apesar das formulações com 5% de fármaco apresentarem resultados maiores de solubilidade, as formulações preparadas com 10% do ácido ursólico foram selecionadas para a caracterização físico-química em função da maior carga de fármaco. Para exemplificar, a solubilidade aquosa do fármaco no sistema disperso pelo método do solvente com 5% de fármaco foi 819,12 μg/mL, comparado a 689,47 μg/mL para o sistema preparado com 10% de fármaco, ou seja, um valor cerca de 20% maior, porém carregado em uma quantidade 50% menor de fármaco. A diferença entre a solubilidade da formulação POLDSS003 e da formulação POLDS004 é estatisticamente significativa, de acordo ao teste t de student com $p < 0.05$.

Para efeito de comparação com outros sistemas, o maior valor de solubilidade do fármaco em dispersões sólidas com Poloxamer 407 é quase três vezes superior à solubilidade do fármaco com Gelucire 50/13 e cem vezes maior que o valor de solubilidade do fármaco em dispersão sólida com PEG 6000. A explicação para estes resultados é que o Poloxamer 407 e o Gelucire 50/13, ao contrário do PEG 6000, possuem propriedades tensoativas, causando a solubilização micelar do fármaco em meio aquoso (KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002). Os resultados também mostram a superioridade do Poloxamer 407, um polímero, em relação ao Gelucire 50/13, uma mistura de lipídeos, no aumento de solubilidade aquosa do ácido ursólico, o que pode ser atribuído ao maior poder tensoativo do Poloxamer 407.

Figura 29. Solubilidade do ácido ursólico em misturas físicas, dispersões sólidas preparadas pelo método da fusão e do solvente, com diferentes proporções de carreador Poloxamer 407. * $P < 0.05$ (teste t de student).

Em resumo, as formulações preparadas pelo método do solvente empregando Poloxamer 407 foram aquelas que permitiram os maiores valores de solubilidade para o ácido ursólico. Por este motivo, escolheu-se esta formulação, preparada com 10% de fármaco, para o estudo da adição de um segundo

tensoativo, o caprato de sódio. Diferente do Poloxamer 407, um tensoativo não-iônico, o caprato de sódio é aniônico e poderia contribuir positivamente no aumento da solubilidade aquosa do ácido ursólico. Os resultados de solubilidade para as dispersões sólidas com caprato de sódio, presentes na Figura 30, foram maiores que a solubilidade da formulação POLDSS003, sem caprato de sódio, e estas diferenças mostraram-se estatisticamente significativas, porém não houve diferença estatística entre os valores de solubilidade das dispersões sólidas preparadas com 10, 20 e 50% (p/p) de caprato de sódio, de acordo ao teste de Tukey, com $p < 0.05$, que compara simultaneamente três grupos ou mais.

Figura 30. Solubilidade do ácido ursólico em misturas físicas e dispersões sólidas preparadas do solvente, com diferentes proporções de carreador caprato de sódio.

4.2.2 Perfil de dissolução

O teste de dissolução assume um papel muito importante nas ciências farmacêuticas pelo seu emprego no controle de qualidade de medicamentos já disponíveis no mercado e na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Na etapa de desenvolvimento, o foco do teste de dissolução é fornecer estimativas da liberação do fármaco, com o objetivo de prever o comportamento *in vivo*. No caso de formas farmacêuticas de liberação imediata, como as dispersões sólidas, a

avaliação do perfil de dissolução é imprescindível, especialmente se a biodisponibilidade é limitada pela taxa de dissolução (AZARMI; ROA; LOBENBERG, 2007).

Com relação à avaliação das formulações desenvolvidas neste trabalho, tentou-se determinar o perfil de dissolução do ácido ursólico em dispersões sólidas e mistura física com PEG 6000, porém não foi possível a quantificação pelo método analítico por CLAE empregado. A justificativa é que a solubilidade do fármaco nestes sistemas é bastante baixa e só pode ser quantificada para as dispersões sólidas empregando o método do solvente, conforme discutido anteriormente. Os principais fatores que contribuem para um aumento da solubilidade e perfil de dissolução em dispersões sólidas preparadas com PEG 6000 é a maior porosidade e molhabilidade do fármaco pelo polímero hidrofílico, como discutido no trabalho de VERHEYEN e colaboradores, em 2002, e a conversão do fármaco para o estado amorfo, porém, para uma molécula altamente lipofílica, como o ácido ursólico, os fatores mencionados não foram suficientes para a melhora do perfil de dissolução do fármaco disperso em PEG 6000.

As formulações empregando Gelucire 50/13 e dióxido de silício coloidal também não puderam ter o seu perfil de dissolução determinado diretamente em tampão fosfato nas condições empregadas no experimento, porém a adição de um tensoativo ao meio, lauril sulfato de sódio, permitiu um aumento da solubilidade e possível quantificação do ácido ursólico. A adição de um tensoativo ao meio de dissolução também pode ser fisiologicamente significativa devido à presença de sais biliares no trato gastrointestinal, que podem favorecer a dissolução de fármacos (DAMIAN et al., 2000; SERAJUDDIN; SHEEN; AUGUSTINE, 1990). Mesmo com a presença do tensoativo no meio de dissolução, a Figura 31 mostra que a dissolução do fármaco foi incompleta e correspondeu a 15% do total de fármaco na mistura física, mesmo valor do fármaco puro, 30% do fármaco em dispersão sólida preparada pelo método da fusão e 60% do fármaco em dispersão sólida preparada pelo método do solvente após duas horas.

Os resultados de perfil de dissolução incompletos do fármaco podem ser explicados pela presença de dióxido de silício coloidal, que pode aumentar a cristalinidade do carreador e possivelmente diminuir a solubilidade do fármaco, além de gelificar ao redor das partículas, retardando a dissolução, o que foi observado

para grioseofulvina carregada em uma mistura de PEG 3000 e dióxido de silício coloidal (SJOKVIST; NYSTROM; ALDÉN, 1989). Por outro lado, a adição de dióxido de silício coloidal é útil porque resolve o problema do amolecimento provocado por carreadores com baixo ponto de fusão como os Gelucires, o que representaria uma importante limitação em termos de processo de fabricação (CHAUHAN; SHIMPI; PARADKAR, 2005).

Figura 31. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico como fármaco livre, em mistura física, em dispersões sólidas com Gelucire 50/13 e SiO₂, preparadas pelos métodos da fusão e solvente em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8, suplementado com 1% de lauril sulfato de sódio.

Os resultados de perfil de dissolução do ácido ursólico em mistura física e dispersões sólidas preparadas com Poloxamer 407 são apresentados na Figura 32. Diferentemente dos produtos manipulados com Gelucire 50/13, não houve a necessidade de adição de lauril sulfato de sódio ao meio de dissolução, o que demonstra a superioridade do Poloxamer 407 com relação ao Gelucire 50/13 para melhorar a solubilidade e perfil de dissolução do ácido ursólico. No estudo de

dissolução, a mistura física exibiu uma dissolução incompleta, correspondendo a aproximadamente 40% do conteúdo do fármaco após 2 horas de experimento. As formulações preparadas pelos dois métodos mostram-se equivalentes no que tange à dissolução, com dissolução completa ao redor de 20 minutos.

Figura 32. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico em mistura física, em dispersões sólidas com Poloxamer 407 preparadas pelos métodos da fusão e solvente em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8.

Investigou-se também a dissolução do ácido ursólico em preparações com Poloxamer 407 em um meio de dissolução ácido, composto por solução de HCl 0,1N, de maneira a mimetizar as condições encontradas no estômago. Os resultados ilustrados na Figura 33 revelam que nestas condições o perfil de dissolução do fármaco é diminuído tanto para as misturas físicas quanto dispersões sólidas, respectivamente, para 20 e 40% após 2 horas. Estas observações são explicadas pelo fato do ácido ursólico ser um ácido fraco, que está mais ionizado, e portanto mais solúvel em meios com o pH maior que o pKa da molécula.

Figura 33. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico em mistura física, em dispersões sólidas com Poloxamer 407 preparadas pelos métodos da fusão e solvente em solução de HCl 0,1N.

O acréscimo do tensoativo caprato de sódio às misturas físicas e dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente contendo Poloxamer 407 manteve a dissolução completa após 20 minutos para os sistemas contendo 20 e 50% de caprato de sódio, conforme demonstrado na Figura 34. As misturas físicas, por outro lado, exibiram um perfil de dissolução equivalente a aproximadamente 40, 60 e 70% de fármaco dissolvido para os produtos contendo, respectivamente, 10, 20 e 50% (p/p) de caprato de sódio, o que demonstra que o aumento do perfil de dissolução é proporcional à quantidade de caprato de sódio adicionada.

Figura 34. Determinação do perfil de dissolução do ácido ursólico em misturas físicas e em dispersões sólidas preparadas pelo método solvente com diferentes proporções do carreador caprato de sódio, em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8.

4.2.3 Citotoxicidade

Figura 35. Citotoxicidade em linhagem celular LLC-MK2 do ácido ursólico em dispersões sólidas e controles sem fármaco.

O ensaio do MTT é amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de várias moléculas em culturas celulares. O princípio deste teste é que o corante lipofílico positivamente carregado é adicionado ao meio celular e endocitado pelas células metabolicamente ativas. Uma vez reduzido pelas células viáveis, ocorre a produção de um composto de coloração roxa, formazan, que é subsequentemente solubilizado em solvente orgânico para dosagem espectrofotométrica. Desta maneira, o ensaio do MTT é considerado um teste de viabilidade celular que funciona eficientemente na maioria dos casos, por isso é utilizado para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, o que é um dos indícios iniciais de segurança do uso de uma medicamento (FISICHELLA et al., 2009).

A citotoxicidade dos sistemas que apresentaram os melhores perfis de dissolução foram analisadas em duas etapas: na primeira, foi investigado o potencial dos carreadores, Gelucire 50/13, Poloxamer 407 e caprato de sódio, em causar

morte da linhagem celular empregada no teste, LLC-MK2, que são células epiteliais de rins de macacos Rhesus, um modelo de células de mamíferos para a avaliação de citotoxicidade. A Figura 35 mostrou que os carreadores avaliados são seguros, nas condições empregadas no teste, até a concentração em que seriam necessários para carrear o fármaco na concentração de 128 μ M, mantendo a viabilidade celular em torno de 100%, com exceção do caprato de sódio, que nesta concentração molar reduz a viabilidade celular para 50%. Porém, estudos já demonstraram a segurança para o uso oral do sal biliar caprato de sódio. A dose letal, DL_{50} , desta molécula foi determinada como sendo de 3.7g/Kg em ratos. Além disso, o caprato de sódio é aprovado pelo FDA como um aditivo alimentar seguro para consumo humano (SMYTH et al., 1962; FDA, 2008).

Na segunda etapa, a citotoxicidade das formulações preparadas pelo método do solvente com foi investigada. A Figura 35 evidenciou que as três formulações revelaram-se seguras, matendo a viabilidade celular até a concentração de 128 μ M, inclusive para a formulação CAPDSS003, que contém 50% de caprato de sódio. Esta formulação também leva em sua composição o Poloxamer 407, que segundo nossas observações, é menos citotóxico para LLC-MK2 do que o caprato de sódio puro.

Em suma, os resultados provaram que as formulações desenvolvidas são seguras, considerando a linhagem celular LLC-MK2, inclusive para concentrações elevadas de fármaco. A demonstração do baixo ou ausente efeito citotóxico em linhagens celulares de mamíferos, juntamente com a avaliação da atividade tripanocida, são consideradas etapas críticas na investigação de compostos com atividade contra a doença de Chagas.

4.2.4 Atividade tripanocida

Inicialmente, compararam-se os efeitos das dispersões sólidas produzidas pelos métodos da fusão e solvente e as misturas físicas preparadas com Poloxamer 407, que apresentaram um melhor perfil de dissolução comparado às formulações preparadas com PEG 6000 ou Gelucire 50/13. Neste experimento, o tratamento oral com estas formulações em camundongos infectados não provocou uma redução

significativa no pico parasitêmico, comparado ao controle sem tratamento. Em contraste, o controle positivo, tratado com benzonidazol, causou uma redução significativa da parasitemia.

Figura 36. Curva parasitêmica de camundongos infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas por administração oral de ácido ursólico (20mg/Kg/dia), em mistura física (POLMF003), dispersão sólida preparada pelo método da fusão (POLDSF003) e dispersão sólida preparada pelo método do solvente (POLDSS003), controles negativos sem tratamento e tratados com solução de Poloxamer 407, e o controle positivo com benzonidazol (20 mg/Kg/dia). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (teste t de student).

Contudo, o tratamento com formulações contendo 20 mg/kg/dia de fármaco foi capaz de provocar uma redução significativa dos níveis parasitêmicos nos dias 10 e 14 após a infecção com *T. cruzi*. Particularmente, a administração com a formulação POLDSS003 provocou uma queda estatisticamente significativa na parasitemia, com negativação no 21º dia da infecção. É importante notar que esta formulação foi a que apresentou os melhores resultados de solubilidade e perfil de dissolução, o que é um indício indireto do aumento da biodisponibilidade do ácido

ursólico e, por este motivo, o método do solvente foi selecionado para a continuação dos estudos, empregando o tensoativo Poloxamer 407.

Figura 37. Parasitemia de camundongos infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* nos dias 10, 14 e 21 após a infecção (dpi) e tratados por administração oral de ácido ursólico (20mg/Kg/dia), em mistura física (POLMF003), dispersão sólida preparada pelo método da fusão (POLDSF003) e dispersão sólida preparada pelo método do solvente (POLDSS003), controles negativos sem tratamento, tratados com solução de Poloxamer 407, e o controle positivo com benzonidazol (20 mg/Kg/dia).). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (teste t de student).

Apesar da redução da parasitemia observada, os resultados obtidos estão em desacordo com outros estudos, que demonstraram a atividade tripanocida maior do ácido ursólico em protocolos *in vitro* e *in vivo*. CUNHA et al., (2006) reportou uma redução significativa dos parasitas no pico parasitêmico empregando o tratamento intraperitoneal de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* com 2 mg/Kg/dia de ácido ursólico. Ainda, FERREIRA et al., (2010) demonstrou que o tratamento oral com 20 mg/Kg/dia do composto é capaz de promover uma redução similar da

parasitemia. É importante notar, contudo, que nestes dois estudos, o fármaco foi solubilizado em DMSO ou em solução aquosa contendo DMSO, Tween e etanol. Portanto, o ácido ursólico foi administrado em solução contendo promotores de absorção oral, tornando o fármaco altamente biodisponível, diferente do presente estudo, onde o fármaco foi administrado em suspensão aquosa.

Há evidência de que a biodisponibilidade do ácido ursólico é também limitada pela absorção oral, porque seu isômero, o ácido oleanólico, já foi demonstrado pertencer a classe IV no sistema de classificação biofarmacêutica (TONG et al., 2011). Por este motivo, a melhora na solubilidade aquosa e perfil de dissolução, como conseguidos pela formulação contendo Poloxamer 407, pode não ser suficiente para o aumento da biodisponibilidade do ácido ursólico, se esta molécula não permear membranas biológicas com facilidade. Para contornar este problema, uma estratégia poderia ser o desenvolvimento de uma formulação contendo um promotor de absorção que, em teoria, poderia aumentar a biodisponibilidade do ácido ursólico e, em consequência, a atividade tripanocida.

O promotor de absorção selecionado para o estudo foi o caprato de sódio, também conhecido como decanoato de sódio, um sal de ácido de graxo contendo 10 carbonos, comumente encontrado no leite, em alguns óleos, como o óleo de coco e na bile (LOWER, 1984). A atuação desta molécula como promotora de absorção foi demonstrada em monocamada de célula Caco-2 e membrana intestinal isolada para uma variedade de fármacos, incluindo antibióticos e heparina. Apesar dos modos de ação do caprato de sódio em humanos não serem plenamente conhecidos, estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o promotor atua tanto nos caminhos transcelulares quanto paracelulares (MAHER et al., 2009). Esta molécula já foi empregada em dispersões sólidas de ácido oleanólico e observou-se um aumento da biodisponibilidade em estudos de farmacocinética (TONG et al., 2011).

Os resultados presentes na Figura 38 mostram que a formulação CAPDSS003, que contém caprato de sódio e poloxamer 407 (1:1), permitiu uma redução significativa da carga parasitária comparada ao grupo controle sem tratamento ou tratado com o placebo. Em comparação, as formulações preparadas com menores proporções de caprato de sódio não permitiram a mesma redução da carga parasitária no pico parasitêmico comparado ao grupo sem tratamento. Este resultado demonstra a necessidade de uma concentração mais alta do caprato de

sódio, um promotor de absorção oral, na potencialização da atividade tripanocida do ácido ursólico, o que certamente está correlacionado com o aumento da biodisponibilidade.

Nota-se que a atividade tripanocida do fármaco foi menor comparada ao benzonidazol, o que já foi reportado previamente (FERREIRA et al., 2010). Por outro lado, a demonstração do aumento da atividade tripanocida do ácido ursólico em dispersões sólidas é bastante relevante porque representa o primeiro esforço que se tem relato para incorporação do fármaco em uma forma farmacêutica destinada ao tratamento da doença de Chagas, permitindo um aumento da biodisponibilidade e eficácia do fármaco. Ainda, julga-se necessária a avaliação das formulações desenvolvidas no tratamento da fase crônica da infecção, na qual o benzonidazol sabidamente apresenta eficácia limitada (PEDROSA et al., 2001).

Figura 38. Curva parasitêmica de camundongos infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e tratadas por administração oral de ácido ursólico (20mg/Kg/dia), em dispersão sólida com 10% de caprato de sódio (CAPDSS001), com 20% de caprato de sódio (CAPDSS002), com 50% de caprato de sódio (CAPDSS003), controles negativos sem tratamento e tratados com solução de caprato de sódio, e o controle positivo com benzonidazol (20 mg/Kg/dia). *** $P < 0.001$ (teste t de student).

5- CONCLUSÃO

Frente aos resultados apresentados e discutidos, conclui-se que a técnica de dispersão sólida é útil para o aumento de solubilidade aquosa e perfil de dissolução do ácido ursólico, particularmente com o emprego de carreadores hidrofílicos com propriedades tensoativas, como o Poloxamer 407 e caprato de sódio. Destaca-se que o método de preparo é crítico no processamento de dispersões sólidas com ácido ursólico, revelando-se o método da evaporação do solvente mais adequado para este fim, por permitir a conversão fármaco para o estado amorfo e a ocorrência de interações intermoleculares por ligações de hidrogênio com os carreadores, acarretando maior solubilidade aquosa e dissolução completa nas condições experimentais empregadas. Ressalta-se que as formulações desenvolvidas mostram-se seguras em experimentos de citotoxicidade, considerando-se a linhagem celular de fibroblastos renais de mamíferos LC-MK2. O perfil de dissolução melhorado do fármaco, aliado à propriedade promotora de absorção do adjuvante caprato de sódio, permitiram o aumento da atividade tripanocida *in vivo* do ácido ursólico em relação ao controle negativo, porém as dispersões sólidas contendo o fármaco mostraram-se menos efetivas do que o benzonidazol no tratamento da fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Contudo, faz-se necessário o estudo das formulações desenvolvidas na fase crônica da infecção para a avaliação completa do potencial do ácido ursólico em dispersão sólida no tratamento da doença de Chagas.

6- REFERÊNCIAS

AHUJA, N.; KATARE, O.P.; SINGH, B. Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water- soluble carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 26-38, 2007.

ALI, W.; WILLIAMS, A.C.; RAWLINSON, C.F. Stochiometrically governed molecular interactions in drug: Poloxamer solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, p.162-168, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003.

AVDEEF, A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 568-590, 2007.

AZARMI, S.; ROA, W.; LOBENBERG, R. Review: Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 12-21, 2007.

AZIZ,D.M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. **Animal reproduction Science**, v. 92, p. 1-8, 2006.

BABU, G.V.M.M.; PRASAD, C.H.D.S.; MURTHY, K.V.R. Evaluation of modified gum karaya as carrier for the dissolution enhancement of poorly water-soluble drug nimodipine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 234, p. 1-17, 2002.

BHISE, S.D. Ternary Solid Dispersions of Fenofibrate with Poloxamer 188 and TPGS for Enhancement of Solubility And Bioavailability. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, p. 583-595, 2011.

BLEY, H.; FUSSNEGGER, B.; BODMEIR, R. Characterization and stability of solid dispersions based on PEG/polymer blends. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 165-173, 2010.

BONACCORSI, I. et al. Endogenous reverse transcriptase as a mediator of ursolic acid's anti-proliferative and differentiating effects in human cancer cell lines. **Cancer letters**, v. 263, p. 130-139, 2008.

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

BRENER, Z; ANDRADE, Z; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

BRITO, N.M. ET al. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

CHAUHAN, B., SHIMP, S., PARADKAR, A. Preparation and Characterization of Etoricoxib Solid Dispersions Using Lipid Carriers by Spray Drying Technique. **AAPS PharmSciTech**, v 6, p. 405-412, 2005.

CHEN, Y. et al. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing Pluronic F-68. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 286, p. 69-80, 2004.

CHEN, Y. et al. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in-vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 259-264, 2005.

CHIARI, E. et al. Potencial use of WR 6026 as prophylaxis against transfusion-transmitted American trypanosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 613-615, 1996.

- CHUTIMAWORAPAN, S. et al. Effect of water soluble carriers on dissolution characteristics of nifedipine solid dispersions. **Drug Delivery and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 1141-1150, 2000.
- COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A Critical Review in Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 97, n.1, p. 3-24, 2002.
- CRAIG, Q.M.D. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymer. **International Journal of Pharmacy**, v. 231, p. 131-134, 2002.
- CRESPO, F.A. et al. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity in *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 79, p. 1062-1068, 2006.
- CUNHA, W.R. et al. A study of trypanosomicidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 474-478, 2006.
- DAMIAN, F. et al. Physicochemical characterization of solid dispersions of the antiviral agent UC-781 with polyethylene glycol 6000 and Gelucire 44/14. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 10, p. 311-322, 2000.
- DANNENFELSER, R.M. et al. Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I: Application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, p. 1165–1175, 2004.
- DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. **Epidemiologia**, p. 33-66, 1997.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, 2002.

DIHENDRA, et al. Solid Dispersions: a Review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, p. 234-246, 2009.

DONG, Y.D.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, p. 101-111, 2011.

DUARTE, L.C. et al. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Sistema de energia dispersiva (EDS) no Estudo de gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v. 30, p 3-15, 2003.

EL-BADRI, M.; FETIH, G.; FATH, M. Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG 4000. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, p. 217-225, 2009.

ELOY, J.O. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**, 2012; in press.

ENGERS, D. et al. A Solid-State Approach to Enable Early Development Compounds: Selection and Animal Bioavailability Studies of Itraconazole Amorphous Solid Dispersion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 3901-3922, 2010.

FDA, Food and Drug Administration. Anonymous, Salts of fatty acids, In: Food additives permitted for direct addition to food for human consumption, US Food and Drug Administration, (2008) CFR 21, Part 3, section 172.860.

FERREIRA, D.S. et al. Trypanossomicidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology Research**, v. 106. p 985-989, 2010.

- FINI, A. et al. Diclofenac salts II. Solid dispersions in PEG6000 and Gelucire 50/13. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 99-11, 2005.
- FISICHELLA, M. et al. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 697-703, 2009.
- FORD, J.L. The current status of solid dispersions. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 61, p. 69-88, 1986.
- FORD, J.L.; MANN, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 422-430, 2012.
- FU, X. et al. Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. **Particuology**, v. 10, p. 203-208, 2012.
- GARLE, M.J.; FENTEM, F.H.; FRYS, J.R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicology in vitro**, v. 8, p. 1303-1312, 1994.
- GNOATTO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC Method to assay total saponins in Ilex Paraguaiensis aqueous extract. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v 16, p. 723-726, 2005.
- GODDEERIS, C.; VAN DEN MOOTER, G. Free flowing solid dispersions of the anti-HIV drug UC 781 with Poloxamer 407 and a maximum amount of TPGS 1000: investigating the relationship between physicochemical characteristics and dissolution behavior. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 104-113, 2008.
- GUEDES, P.M. et al. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, p. 609-620, 2011.

- HAIDA K.S. et al. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 4, p. 61, 2011
- HIGUCHI, M. et al. Pathophysiology of the heart in Chagas´disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, p. 96-107, 2003.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Phase solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.
- HILL, J. For Better Thermal Analysis and Calorimetry. **International Conference of Thermal Analysis**, p. 10-11, 1991.
- HOARE, C.A.; WALLACE, F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 212. p. 1385-1386, 1966.
- HORIUCHI, K. et al. Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnasol from *Salvia Officinalis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 287-290, 2007.
- HORTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 25, p. 3-14, 2001.
- HOTEZ, P.J. et al. The neglected tropical disease of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and roadmap for control and elimination. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 2, e300, 2008.
- ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, **2005**
- JAMES K. Solubility and related properties, vol. 28, Marcel Dekker Inc., Newyork, 986, 127 –146, 1986.

- JANG, S.M. et al. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 113-119, 2009.
- JEONG, D.H; KIM H.G; HWANG, Y.P. Involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. **Toxicology Letters**, v. 155, p. 369-376, 2005.
- JONES, M.C.; LEROUX, J.C. Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmacy and Biopharmacy**, v. 48, p. 101-11, 1999.
- KABANOV, K.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of the Controlled Release**, v. 82, p. 189-212, 2002.
- KARATAS, A.; YUKSEL, N.; BAYKARA, T. Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. **Farmaco**, v. 60, p. 777-782, 2005.
- KIM, E.J. et al. Preparation of a solid dispersion of felodipine using a solvent wetting method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 200-205, 2006.
- KONTOGIANI, V. G. et al. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 188-195, 2009.
- LEE, S.H. et al. Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo. **Pharmacology Research**, v. 58, p. 290-296, 2008.

- LEE J. et al. Ursolic acid ameliorates thymic atrophy and hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice. **Chemical-Biological Interaction**, v. 108, p. 635-642, 2010.
- LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 47–60, 2000.
- LI, G. et al. Highly sensitive and selective pre-column derivatization high-performance liquid chromatography approach for rapid determination of triterpenes oleanolic and ursolic acids and application to Swertia species: Optimization of triterpenic acids extraction and pre-column derivatization using response surface methodology **Analytica Chimica Acta**, v. 688, p. 208-218, 2011.
- LI, R. et al. The influence of cosolvent on the complexation of HP-beta-cyclodextrins with oleanolic acid and ursolic acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 40, p. 1137 - 1144, 2009
- LIU, J. Oleanolic acid and Ursolic acid: Research Prospectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92-94, 2005.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.
- LOPES, L.B. et al. Advance directives for hormone administration in replacement therapy and contraception. **Current Topics in Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 335 – 351, 2003.
- LOWER, E.S. Capric acid-uses and properties. **Manufacturing Chemist**, v. 55, p. 61-63, 1984.

MAHER, S. et al. Safety and efficacy of sodium caprate in promoting oral drug absorption: from in vitro to the clinic. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1427-1449, 2009.

MARIN, M.T.; MARGARIT, M.V.; SALCEDO, G.E. Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone. **Farmaco**, v. 57, p. 723-727, 2002.

MAULVI, F.A. et al. Improvement of dissolution rate of aceclofenac by solid dispersion technique. **Powder Technology**, v. 207, p. 47-54, 2011.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 17-30, 2009.

MONEGHINI, M.; ZINGONE, G.; ZORDI, N. Influence of the microwave technology on the physical–chemical properties of solid dispersion with nimesulide. **Powder Technology**, v. 195, p. 259-263, 2009.

MOREL, C.M.; LAZDINS, J. Chagas Disease. **Nature Reviews Microbiology**. v.1, p. 13-15, 2003.

NAIMA, Z. et al. Interactions between carbamazepine and polyethylene glycol (PEG) 6000: characterizations of the physical, solid dispersed and eutectic mixtures. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 395–404, 2010.

NEPAL, P.R.; HAN, H.K.; CHOI, H.K. Enhancement of solubility and dissolution of Coenzyme Q10 using solid dispersion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 147-153, 2010.

NEWA, M et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, p. 228-237, 2007.

OVESNA, Z. et al. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds, Minireview. **Neoplasma**, v. 51, p. 327-333, 2004.

PAPAGEGEOU, G.Z. et al. Effect of Physical State and Particle Size Distribution on Dissolution Enhancement of Nimodipine/PEG Solid Dispersions Prepared by Melt Mixing and Solvent Evaporation. **AAPS Journal**, v. 8, p. 623-663, 2006.

PATEL, T.B. et al. Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of drug insoluble in gastric fluid by spray dried microparticles. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, p. 185-193, 2010.

PEDROSA, R.C. et al. Time-dependent oxidative stress caused by benzonidazole. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PRASAD, S. et al. Ursolic acid, a pentacyclin triterpene, potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent up-regulation of death receptors: evidence for the role of reactive oxygen species and JNK. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 5546-5557, 2011.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1.p. 92-100, 2001.

RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N.R. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B-radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chemical-Biological Interaction**, v. 176, p. 99-107, 2008.

RAPHAEL, T.J.; KUTAAN. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**, v. 10, p. 483-489, 2003.

- REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1109-1143, 2005.
- RESENDE, F.A. et al. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Sciences**, v. 79, p. 1268-1273, 2006.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, I. et al. New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 3, e484, 2009.
- RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of To-71051 on parasitemia and tissue parasitism. **Le Progrès Médical**, v. 101, p. 282, 1973.
- ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 576-588, 2010.
- SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K.V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sciences**, v. 78, p. 713-718, 2006.
- SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on absorption of eutectic mixtures. I. A comparison of the behavior of eutectic mixtures of sulphathiazole and that of ordinary sulphathiazole in man. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, p. 866-872, 1961.
- SENEDESE, J.M. et al. Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells in vitro

and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 1 – 7, 2008.

SERAJUDDIN, A.T. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 1058–1066, 1999.

SERAJUDDIN, A.T.M.; SHENN, P.C.; AUGUSTINE, M.A. Improved dissolution of a poorly water-soluble drug from solid dispersions in polyethylene: polysorbate 80. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 463-464, 1990.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersion of carbamazepine in PVP k-30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, p. 1-10, 2004.

SHAH, J. et al. Enhancement of dissolution rate of valdecoxib by solid dispersions technique with PVP K 30 & PEG 4000: preparation and in vitro evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 63, p. 69-75, 2009

SHUR, J.; PRICE, R. Advanced microscopy techniques to assess solid-state properties of inhalation medicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 369-383, 2012.

SJOKVIST, W.; NYSTROM, C.; ALDEN, M. Physicochemical aspects of drug release. IX. Investigation of some factors that impair dissolution of drugs from solid particulate dispersion systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, p. 161-170, 1989.

SMYTH JR, H.F. et al. Range-finding toxicity data. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. J23, p. 95-107, 1962.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2010

- SOMOVA, L.O. et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, p. 115-121, 2003.
- STREUBEL, A.; JUERGEN, S.; BODMEIER, R. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 501–508, 2006.
- SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 445–462, 2009.
- TACHIBANA, T.; NAKAMURA, A. A method for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: dispersion of beta-carotene by polyvinylpyrrolidone. **Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere**, v. 203, p. 130-133, 1965.
- TAKADA, K. et al. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoids acids, suppress TNF- α -induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1114-1119, 2010.
- TAYLOR, L.S.; ZOGRIFI, G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 1691-1698, 1997.
- TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURN, A. Evolution and pathology in Chagas disease. A Review. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 463-491, 2006.
- TERPUGOV, E.L.; DEGTYAREVA, O.V. Infrared emission from photoexcited bacteriorhodopsin: studies by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 565, p. 287-292, 2001.

THI, V.T.N.Y.; SHAO, H.R. Preparation of oleanolic acid solid dispersion systems and their dissolution in vitro. **Journal of China Pharmaceutical University**, v. 34, p. 236-239, 2003.

TONG, H.H.Y. et al. Spray freeze drying with polyvinylpyrrolidone and sodium caprate for improved dissolution and oral bioavailability of oleanolic acid, a BCS class IV compound. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, p. 148-158, 2011

TROUILLER, P. et al. 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.; DOCAMPO, R. Specific Chemotherapy for Chagas Disease: controversies and Advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

VASCONCELOS, M.A.L. et al. Evaluation of in vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Z Naturforsch**, v. 61. p. 477-482, 2006.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 1068-1075, 2007.

VERHEYEN, S. et al. Mechanisms of increased dissolution of diazepam and temazepam from polyethylene glycol 6000 solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 45-58, 2002.

VINHAES, M.C. The situation of Southern Cone Initiative. XI Meeting of the Intergovernmental Commission of the Southern Cone Initiative for the elimination of *Triatona infestans* and the control of transfusion transmission of Chagas disease, 2002.

- VIPPAGUNTA, S. et al. Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 111-123, 2002.
- VITEZ, I.M. et al. The evolution of hot-stage microscopy to aid solid-state characterizations of pharmaceutical solids. **Thermochimica Acta**, v. 21, p. 187-196, 1998.
- XI, J. et al. Formulation Development and Bioavailability Evaluation of a Self-Nanoemulsified Drug Delivery System of Oleanolic Acid. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, p. 172-182, 2009.
- WANG, Z.H. et al. Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, p. 255-260, 2010.
- WENDHAUSEN, P.A. Caracterização de materiais III. **Análises Térmicas**, v. 1, p. 223-245, 2005.
- WERNER, B.; INÉS Z. A. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Revista Medica de Chile**, v. 139, p. 247-257, 2011.
- WHO - World Health Organization. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina, 2005.
- WHO – World Health Organization. Control of Chagas Disease. Technical Report Series. p. 811, 1991.
- WON, D.A. et al. Improved physicochemical characteristics of felodipine solid dispersions particles by supercritical anti-solvent precipitation properties. **International Journal of Pharmacy**, v. 301, p. 199-208, 2005.
- WONG, L.W.; PILPEL, N. The effect of particle shape on the mechanical properties of powders. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 59, p. 145-154, 1990.

WU, C.Y.; BENET, L.Z. Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, p. 11–23, 2005.

YASUNIWA, M.; TSUBAKIHARA, S.; FUJIOKA, T. X-ray and DSC studies on the melt-recrystallization process of poly(butylene naphthalate). **Thermochimica Acta**, v. 396, p. 75-78, 2003.

ZAHIRUL, M.; KHAN, I. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with in vivo data: challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 140, p. 131-143, 1996.