NO 5 1471574
V = 269122

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

OK DBOC 9 19/08/05
da terminae 08/08/05

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**COACERVAÇÃO COMPLEXA DE COMPOSTOS
NITRO-HETEROCÍCLICOS**
OBTENÇÃO DE MICROCÁPSULAS E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTICHAGÁSICA

MARCOS FURLANETTO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

São Paulo
2005

38147

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010567

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F985c Furlanetto, Marcos
Coacervação complexa de compostos nitro-heterocíclicos :
obtenção de microcápsulas e avaliação da atividade
antichagásica Marcos Furlanetto. -- São Paulo, 2005.
99p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Tavares, Leoberto Costa

1. Farmacotécnica 2. Farmacologia 3. Parasitologia
4. Química farmacêutica I. T. II Tavares, Leoberto
Costa, orientador.

615.4 CDD

Marcos Furlanetto

Coacervação complexa de compostos nitro-heterocíclicos.
Obtenção de microcápsulas e avaliação da atividade antichagásica

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 17 de Maio de 2005.

**Dedico este trabalho aos
meus pais, Hernando e Maria,
exemplos de honestidade,
responsabilidade e retitude, que
dedicaram suas vidas à
formação da minha.**

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, pelos ensinamentos, pela orientação desde os tempos de iniciação científica e a constante amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade para realização deste trabalho.

Às minhas amigas Andrea Masunari e Márcia Maria Afonso Lima Dias e ao meu amigo Vanderson Galan pela constante companhia ao longo desses anos, os conselhos, ensinamentos e pelas boas horas de descontração proporcionadas.

A mestre e amiga Maria das Graças Baptista dos Santos, pelos ensinamentos passados, pelo carinho e atenção dispensados.

Aos amigos e amigas de laboratório, que de uma forma ou de outra contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr. e à Prof. Titular Tereza Cristina Vessoni Penna por cederem as instalações dos seus laboratórios, tão importantes para a execução deste trabalho.

À Prof. Titular Carmem C. Tadini (Politécnica-USP) por permitir o uso do aparelho de atomização.

À Prof. Titular Maria Júlia Manso Alves (IQ-USP) por ceder as instalações do seu laboratório permitindo a realização dos ensaios biológicos.

A mestre Marinei Ferreira Gonçalves (IQ-USP) pelos ensinamentos e ajuda na execução dos ensaios biológicos.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro e bolsa concedidos.

As bibliotecárias do Conjunto das Químicas, Adriana e Leila, pela revisão das referências bibliográficas e constante auxílio na localização de livros e periódicos. Também agradeço a todos(as) os(as) outros(as) funcionários(as) desta biblioteca.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVO E JUSTIFICATIVA.....	4
2.1 – OBJETIVO.....	5
2.1.1 – Objetivo geral.....	5
2.1.2 – Objetivos específicos.....	5
2.2 – JUSTIFICATIVA.....	5
3 – FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1 – DOENÇA DE CHAGAS.....	9
3.1.1 – Ciclo e formas evolutivas.....	9
3.1.2 – Epidemiologia e aspectos sociais.....	11
3.1.3 – Terapêutica.....	12
3.1.4 – Ensaios de fármacos e candidatos a fármaco frente ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3.2 – COMPOSTOS NITRO-HETEROCÍCLICOS.....	15
3.3 – MICROENCAPSULAÇÃO.....	18

3.3.1 – Técnicas de obtenção de microcápsulas.....	19
3.3.2 – Substâncias utilizadas como material de revestimento.....	20
3.3.2.1 – Goma arábica.....	21
3.3.2.2 – Gelatina.....	22
3.3.3 – Mecanismos de liberação dos princípios ativos.....	24
3.3.4 – Microencapsulação pela técnica de Coacervação.....	25
3.3.4.1 – Coacervação simples.....	26
3.3.4.2 – Coacervação complexa.....	27
3.3.4.2.1 – Descrição teórica da coacervação complexa.....	30
3.3.5 – Secagem por atomização.....	32
3.3.6 – Emprego de microcápsulas obtidas por coacervação complexa....	34
4 – PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1 – MATÉRIAS-PRIMAS E EQUIPAMENTOS.....	37
4.2 – MÉTODOS.....	37
4.2.1 – Ensaio preliminares para a microencapsulação.....	37
4.2.2 – Técnica de microencapsulação.....	38
4.2.3 – Secagem das microcápsulas.....	40
4.2.3.1 – Secagem com álcoois.....	40
4.2.3.2 – Secagem por atomização.....	40
4.2.4 – Análise microscópica.....	41
4.2.5 – Avaliação da interferência do material de encapsulação.....	42
4.2.6 - Obtenção das curvas de absorção no UV-VIS.....	42
4.2.7 – Construção da curva de calibração.....	42

4.2.8 – Dosagem dos nitro compostos microencapsulados e porcentagem de microencapsulação.....	42
4.2.9 – Ensaios biológicos <i>in vitro</i> dos nitro compostos frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
4.2.9.1 – Meio de cultura.....	43
4.2.9.2 – Condições de Cultivo.....	44
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 – ENSAIOS PRELIMINARES PARA A MICROENCAPSULAÇÃO.....	46
5.2 – PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROENCAPSULAÇÃO E SECAGEM DAS MICROCÁPSULAS.....	47
5.3 – IDENTIFICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	50
5.4 – AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO MATERIAL DE ENCAPSULAÇÃO.....	69
5.5 – OBTENÇÃO DAS CURVAS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS.....	69
5.6 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	71
5.7 – DOSAGEM DOS NITRO COMPOSTOS MICROENCAPSULADOS E PORCENTAGEM DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	73

5.8 – ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	78
6- CONCLUSÕES.....	85
7–ANEXOS.....	87
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Principais técnicas de obtenção de microcápsulas.....	20
TABELA 2 – Matérias-primas utilizadas em microencapsulação.....	21
TABELA 3 – Rendimento de coacervado de acordo com a porcentagem de gelatina e goma arábica em presença de três valores de pH.....	46
TABELA 4 – Influência da centrifugação sobre o rendimento de coacervado e % de microencapsulação.....	49
TABELA 5 – Absorbâncias das amostras do ensaio C.....	73
TABELA 6 – Absorbâncias das amostras do ensaio D.....	73
TABELA 7 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida</i> em microcápsulas.....	74
TABELA 8 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-nitrobenzidrazida</i> em microcápsulas.....	74
TABELA 9 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-clorobenzidrazida</i> em microcápsulas.....	75
TABELA 10 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-bromobenzidrazida</i> em microcápsulas.....	75
TABELA 11 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida</i> em microcápsulas.....	76
TABELA 12 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-nitrobenzidrazida</i> em microcápsulas.....	76
TABELA 13 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-clorobenzidrazida</i> em microcápsulas.....	77
TABELA 14 – Doseamento de <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-bromobenzidrazida</i> em microcápsulas.....	77

TABELA 15 – Número médio de formas epimastigotas após	
tratamento com 50 µg/mL de nitro derivados.....	79
TABELA 16 – Número médio de formas epimastigotas após	
tratamento com microcápsulas sem nitro composto e DMSO 5%..	80
TABELA 17 – Número médio de formas epimastigotas após	
tratamento com benznidazol em duas concentrações.....	81
TABELA 18 – Número médio de formas epimastigotas após	
tratamento com 50 µg/mL de nitro derivados microencapsulados.	
Produto seco por álcoois.....	83
TABELA 19 – Número médio de formas epimastigotas após	
tratamento com 50 µg/mL de nitro derivados microencapsulados.	
Produto seco por atomizador.....	83
TABELA 20 – Redução populacional das formas epimastigotas, em	
porcentagem, após tratamento com 50 µg/mL de nitro derivados	
microencapsulados. Produto seco por álcoois.....	84
TABELA 21 – Redução populacional das formas epimastigotas, em	
porcentagem, após tratamento com 50 µg/mL de nitro derivados	
microencapsulados. Produto seco por atomizador.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química da nifuroxazida.....	6
FIGURA 2: Representação esquemática do ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
FIGURA 3: Distribuição mundial da doença de Chagas.....	12
FIGURA 4: Grupo farmacofóro dos compostos nitro-heterocíclicos.....	16
FIGURA 5: Possíveis vias de bioativação dos compostos nitrofurânicos.....	17
FIGURA 6: Estrutura física de microcápsulas.....	19
FIGURA 7: Estrutura da cadeia principal da goma arábica.....	22
FIGURA 8: Ionização da gelatina.....	23
FIGURA 9: Processo de obtenção da gelatina ácida e básica a partir do colágeno.....	24
FIGURA 10: Representação esquemática da formação de coacervado com indicação das microcápsulas formadas.....	28
FIGURA 11: Diagrama esquemático de secador por atomização com disco centrífugo.....	34
FIGURA 12: Aparelhagem utilizada na obtenção de microcapsulas.....	38
FIGURA 13: Fluxograma para a obtenção das microcápsulas de derivados nitro-heterocíclicos.....	39
FIGURA 14: Esquema do aparelho do atomizador utilizado neste trabalho e detalhe do disco rotativo do atomizador.....	41
FIGURA 15: Aglomerado de coacervado seco.....	49
FIGURA 16: Microscopia óptica do coacervado amorfo (400X).....	50

FIGURA 17: Microscopia óptica de coacervado. Presença de material amorfo entre as microcápsulas (400x).....	51
FIGURA 18: Microscopia óptica de microcápsulas, recém preparadas (400x).....	52
FIGURA 19: Nitro derivados dispersos em solução de gelatina e goma arábica (100x).....	53
FIGURA 20: Microcápsulas sem nitro composto.....	54
FIGURA 21: Microcápsulas secas por álcoois sem nitro composto.....	55
FIGURA 22: Microcápsulas secas por atomização sem nitro composto	56
FIGURA 23: Microcápsulas contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-bromobenzidrazida</i> recém preparadas.....	57
FIGURA 24: Microcápsulas contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>benzidrazida</i> recém preparadas.....	58
FIGURA 25: Microcápsulas contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-nitrobenzidrazida</i> recém preparadas.....	59
FIGURA 26: Microcápsulas contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-clorobenzidrazida</i> recém preparadas.....	60
FIGURA 27: Microcápsulas secas por álcoois contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-nitrobenzidrazida</i>	61
FIGURA 28: Microcápsulas secas por álcoois contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-bromobenzidrazida</i>	62
FIGURA 29: Microcápsulas secas por álcoois contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>benzidrazida</i>	63
FIGURA 30: Microcápsulas secas por álcoois contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno</i> <i>4-clorobenzidrazida</i>	64

FIGURA 31: Microcápsulas secas por atomização contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida</i>	65
FIGURA 32: Microcápsulas secas por atomização contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida</i>	66
FIGURA 33: Microcápsulas secas por atomização contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida</i>	67
FIGURA 34: Microcápsulas secas por atomização contendo <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida</i>	68
FIGURA 35: Curva de absorção no UV-VIS da <i>5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida</i> , em DMSO.....	69
FIGURA 36: Curva de absorção no UV-VIS da <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida</i> , em DMSO.....	70
FIGURA 37: Curva de absorção no UV-VIS da <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida</i> , em DMSO.....	70
FIGURA 38: Curva de absorção no UV-VIS da <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida</i> , em DMSO.....	71
FIGURA 39: Curva de calibração da <i>5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida</i>	71
FIGURA 40: Curva de calibração da <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida</i>	72
FIGURA 41: Curva de calibração da <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida</i>	72
FIGURA 42: Curva de calibração da <i>5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida</i> , em DMSO.....	72

FIGURA 43: Aspecto macroscópico de microcápsulas contendo o nitro composto (A), microcápsulas sem o composto (B) e do nitro composto puro(C).....	88
FIGURA 44: Mistura gelatina-goma arábica antes (à direita) e após correção do pH (à esquerda).....	88

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DMSO: dimetilsulfóxido

G6PD: glicose-6-fosfato-desidrogenase

IV: intravenosa

LIT: *liver infusion tryptose*

pI: ponto isoelétrico

UV: ultravioleta

λ_{MAX} : comprimento de onda máximo de absorção

Resumo

A Doença de Chagas atualmente atinge a vida de aproximadamente 18 milhões de portadores do parasita. Assim, este trabalho, parte de um estudo mais amplo, teve como objetivo avaliar a atividade biológica de compostos nitro-heterocíclicos com estrutura análoga à nifuroxazida, 5-nitro-2-furfurilideno 4-hidroxibenzidrazida, frente à cepa Y de *Trypanosoma cruzi* antes e após a sua microencapsulação por coacervação complexa de gelatina e goma-arábica, que, em geral, se mostram pouco solúveis nos meios e concentração empregados em testes farmacológicos, indicando a necessidade do desenvolvimento de um sistema vetorial que poderá melhorar o perfil farmacológico destes compostos. Assim, padronizou-se técnica de microencapsulação, a partir de resultados de ensaios preliminares e dados da literatura, e empregou-se dois métodos de secagem das microcápsulas, a saber: álcoois e atomização. Exame microscópico dos produtos secos confirmou a formação das microcápsulas possibilitando visualizar a diferença entre os produtos obtidos pelos dois métodos de secagem, para os quais, obteve-se rendimento de microcápsulas de $76 \pm 3,6$ % e $61 \pm 5,1$ % e porcentagem de microencapsulação de $66 \pm 12,0$ e $24,5 \pm 5,3$ respectivamente. Obteve-se curva de absorção e de calibração dos compostos analisados, em DMSO, observando-se que não há interferência do complexo gelatina-goma arábica sobre a absorção UV dos compostos possibilitando determinação confiável da concentração destes nas microcápsulas. Ensaios *in vitro* demonstraram a não interferência do material de encapsulação e do solvente utilizado (DMSO 5%) sobre o desenvolvimento parasitário. Os compostos puros (50 $\mu\text{g/mL}$) se mostraram bastante ativos eliminando 100% das formas parasitárias em 48 horas, enquanto que, com benznidazol (100 $\mu\text{g/mL}$) no 12º dia de experimento ainda haviam formas evolutivas viáveis. Os produtos secos por atomização tiveram um comportamento antichagásico semelhante aos compostos puros reduzindo a população parasitária em $63 \pm 10\%$ em 24 horas ($64 \pm 13\%$ compostos puros) não sendo um método adequado para liberação prolongada. Os produtos secos por álcoois permitiram este tipo de liberação devido à integridade das microcápsulas, observada ao microscópio, e em 24 horas houve redução de apenas $20 \pm 9\%$ da população, necessitando de 96 horas para eliminação total dos parasitas. Assim, a microencapsulação e a secagem por álcoois utilizados resultaram em liberação lenta

dos nitro compostos indicando a possibilidade de utilização deste sistema vetor em estudos mais aprofundados com vistas a melhorar a eficácia antichagásica desses compostos.

Abstract

Chagas' Disease reaches whole Latin America exposing 100 million people to infection risk, harming seriously 18 million patients' life. Thus, the aim of this work was evaluate biological activity of nitro-heterocyclics compounds with similar structure of nifuroxazide, 5-nitro-2-furaldehyde *p*-hydroxy-benzoylhydrazone, against *Trypanosoma cruzi*, strain Y, before and after microencapsulation by complex coacervation of gelatin and gum arabic. These compounds, in general, are poorly soluble in concentration used in pharmacological tests, thus the development of a vectorial system will improve pharmacological profile of them. Microencapsulation method was defined based on literature data and preliminary assays and It was used two drying methods: isopropanol-ethanol addition, or spray-drying. Microscopic examination of dried products shown morphological difference between alcohols and spray-dried microcapsules. Microencapsulation percentage average yields were $66.0 \pm 12.0\%$ and $24.5 \pm 5.3\%$ and coacervate yields were $76.0 \pm 3.6\%$ and $61.0 \pm 5.1\%$ respectively. After determination of λ_{MAX} and standard curves, with DMSO, it was observed no interference of gelatin-acacia complex in UV absorption, making possible reliable dosage of nitro-compounds in microcapsules. *In vitro* studies have not shown interference of unloaded microcapsules or DMSO 5% on parasite's growth. Solutions used of free nitro-heterocyclics ($50 \mu\text{g/mL}$) were plenty active against *T. cruzi*, have shown population reduction of 100% in 48 hours, however, benznidazol ($100 \mu\text{g/mL}$) in 12th day experiment there were still viable parasitic forms. Dried products by spray-drying had antichagasic behavior similar to pure compounds, with parasitic population reduction of $63 \pm 10\%$ in 24 hours ($64 \pm 13\%$ pure compounds) not being appropriate method for extended release. Dried products by alcohols allowed this liberation type due to integrity of microcapsules, observed by microscope, and in 24 hours there was reduction of only $20 \pm 9\%$ of the population, needing 96 hours for total parasites' elimination. Thus, microencapsulation and drying method using alcohols resulted in slow liberation rates of nitro compounds indicating the possibility of use this vectorial system in studies with views to improve the antichagasic effect of those compounds.

1 – Introdução

Desde a caracterização da Doença de Chagas em 1909 pelo médico-pesquisador Carlos Chagas, esforços vêm sendo realizados a fim de se encontrar a cura para esta moléstia. Entretanto, os poucos fármacos atualmente disponíveis para o "tratamento" desta doença se mostram ineficazes limitando os pacientes a terapias sintomáticas. Desta forma o controle da disseminação desta doença se tornou restrito ao combate do inseto vetor, conhecido como barbeiro, e ao controle nos bancos de sangue (FOYE, 1995).

Face a este problema, realizou-se, neste trabalho, a avaliação da atividade biológica de compostos 5-nitro-heterocíclicos frente à cepa Y de *T. cruzi* antes e após a sua microencapsulação por coacervação. Para isto padronizou-se método de obtenção de microcápsulas contendo estes compostos empregando-se a técnica de coacervação complexa em fase aquosa, utilizando gelatina e goma-arábica como material de revestimento (FOYE, 1995).

O termo coacervação tem sido empregado para descrever o fenômeno de separação de fases, em solução coloidal de substância macromolecular, como, por exemplo, pela adição de uma outra substância ou pela variação de temperatura, obtendo-se uma fase rica em colóide e a outra quase isenta dele. A coacervação, que pode ser simples e complexa, trata-se de fenômeno que está intrinsecamente envolvido na formação de complexos de proteínas e polissacarídeos. A coacervação simples depende do grau de hidratação do agente hidrofílico, por exemplo, etanol, que é adicionado à solução aquosa do colóide ocorrendo assim a separação de fases. A coacervação complexa, por sua vez, depende basicamente do pH do sistema, sendo constituída por dois solutos coloidais com cargas opostas que se polimerizam frente à variação do pH (PRISTA, 1992).

O processo de microencapsulação é usado para revestir partículas sólidas, líquidas ou gasosas e apresenta diversas aplicações como modulação do odor e/ou sabor e prevenção da volatilização de substâncias é, também, ferramenta mais atrativa quando se deseja evitar a oxidação, degradação, incompatibilidade em misturas, proteger o material microencapsulado do meio ambiente e vice-versa, ajudar na dispersão e solubilização de substâncias insolúveis em água e

no prolongamento e/ou controle da sua liberação especialmente em sistemas biológicos (TAKENAKA, 1980).

A tecnologia de microencapsulação se aplica a inúmeros setores industriais como os setores de alimentos, de agrotóxicos, de cosméticos, de domissanitários, de perfumes e de medicamentos, apresentando valor estratégico para o país, pois, pode propiciar o aumento da competitividade no setor industrial com a obtenção local de produtos tecnologicamente superiores (SHAHIDI & HAN, 1993).

2 – Objetivo e Justificativa

2.1 – Objetivo

2.1.1 – Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica de compostos nitro-heterocíclicos com estrutura análoga à nifuroxazida, *5-nitro-2-furfurilideno 4-hidroxibenzidrazida*, frente à cepa Y de *Trypanosoma cruzi* antes e após a sua microencapsulação por coacervação complexa de gelatina e goma-arábica.

2.1.2 – Objetivos específicos

- Padronizar o método de microencapsulação e secagem das microcápsulas;
- Determinar precisamente a concentração de compostos nitro-heterocíclicos nas microcápsulas e avaliar a atividade biológica desses produtos frente à cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 – Justificativa

A tripanossomíase americana é doença endêmica que atinge ampla área da América, prejudicando gravemente a saúde dos indivíduos afetados. Abrange uma área situada entre o sul dos Estados Unidos da América até a Argentina, expondo 100 milhões de pessoas ao risco de infecção que estão distribuídas em 21 países, incluindo o Brasil. A estimativa do número de portadores da Doença de Chagas atinge números da ordem de 16 a 18 milhões e são registradas 50.000 mortes anuais ocasionadas por esta hemoparasitose (WHO, 2002).

Vários compostos benzidrazídicos com estrutura análoga à nifuroxazida já foram sintetizados e se encontram disponíveis no Laboratório de Planejamento e Desenvolvidos de Fármacos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP (MASUNARI *et al*, 2002, 2003; TAVARES, 1993; TAVARES *et al*, 1997; FURLANETTO *et al*, 2001, 2002; CHISTÉ, 1998; REZENDE *et al*, 2002), sob coordenação do Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares, orientador deste trabalho. A maioria destes compostos se mostram bastante

ativos frente à cepa padrão (ATCC 25923) bem como frente à cepa (3SP/R33) de *Staphylococcus aureus* com caráter de multi-resistência (OLIVEIRA *et al*, 2001). Vários desses compostos já foram testados e também se mostraram ativos frente ao bacilo da tuberculose (RANDO *et al*, 2002) e é muito provável que estes compostos também possam apresentar atividade frente a diferentes hemoparasitoses, entre elas a Doença de Chagas. Apresenta-se na figura 1 a estrutura química da nifuroxazida.

FIGURA 1: Estrutura química da nifuroxazida.

Estudos de QSAR, *Quantitative Structure Activity-Relationships*, realizados por REZENDE, 2002; REZENDE *et al*, 2002; MASUNARI *et al*, 2002 e MASUNARI *et al*, 2003, demonstram que derivados dos anéis 5-nitrofurânico e 5-nitrotiofênico apresentam relação direta entre a atividade biológica e a lipossolubilidade em *S. aureus*. Esses estudos têm orientado a escolha de novos grupos substituintes que são introduzidos nessas moléculas obtendo-se análogos mais ativos que o fármaco padrão. Foi observado, entretanto, que a maioria dos compostos mais ativos apresenta alta hidrofobicidade, o que dificulta a sua solubilidade nos meios de cultura. A pouca solubilidade destes compostos poderia, portanto, dificultar os ensaios *in vitro* ou *in vivo* com a cepa de *Trypanosoma cruzi*. Assim, a microencapsulação possibilitaria uma melhor solubilização desses compostos e por tratar-se de um método de liberação prolongada (ANSEL *et al*, 2000) poderá ser utilizado para melhorar tanto o perfil farmacológico destes compostos como para diminuir efeitos colaterais resultantes de picos plasmáticos (AKIYAMA *et al*, 1994).

Nas formas farmacêuticas tradicionais como cápsulas e comprimidos o fármaco é combinado com excipientes que o preservam, retardando ou facilitando sua dissolução após administração (ZANOWIAK, 1982). A concentração plasmática diminui paulatinamente entre os intervalos de administração até a próxima dose provocar novo pico plasmático. Este pico pode, portanto, ser

responsável por efeitos colaterais e tóxicos causando desconforto ao paciente e até mesmo o abandono do tratamento (AKIYAMA *et al*; 1994 ZANOWIAK, 1982; BIDAHA & VERGNAUD, 1991). Uma forma de evitar ou amenizar esta situação é o uso de sistemas vetores de fármacos que possibilitem liberação prolongada mantendo o nível de concentração plasmática estável e dentro da faixa terapêutica.

A técnica de coacervação complexa, muito aplicada na vetorização de fármacos, utiliza diversos agentes encapsuladores, destacando-se a gelatina, que é um biopolímero obtido a partir da hidrólise do colágeno, e a goma arábica, um biopolissacarídeo obtido a partir do exudato do caule e ramos da *Acacia senegal*. Estes materiais apresentam vantagens importantes como ausência de efeitos tóxicos, não representando risco tanto ao ser humano como ao meio ambiente, são economicamente viáveis e de fácil acesso (SHAHIDI & HAN, 1993; USP, 1992; WADE & WELLER, 1994).

Tanto a gelatina como a goma arábica praticamente não interferem no crescimento de bactérias como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (JAVIDAN & MRTEK, 1973) e de hemoparasitas como o *Trypanosoma cruzi* e não necessitam de utilização de solventes orgânicos em sua manipulação evitando, assim, possíveis efeitos tóxicos resultantes da presença de resquícios destes solventes.

3 – *Fundamentação Bibliográfica*

3.1 – Doença de Chagas

A tripanossomíase americana ou Doença de Chagas tem por agente causal o *Trypanosoma cruzi*, que determina, no homem, quadros clínicos com características e conseqüências variadas. Há, no entanto, indivíduos infectados que não apresentam sinais ou sintomas permanecendo desta forma, como portadores assintomáticos. Destacam-se, por sua gravidade, a cardiopatia chagásica e a dilatação de órgãos cavitários como esôfago, cólon e outros. Ressalta-se que as lesões cardíacas são responsáveis por elevado índice de mortalidade, especialmente na fase crônica da doença (FOYE *et al*, 1995; REY, 2001).

3.1.1 – Ciclo e formas evolutivas

O protozoário *Trypanosoma cruzi* exibe em seu ciclo evolutivo, figura 2, as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota e formas de transição entre elas. Nos hospedeiros vertebrados encontra-se as formas tripomastigotas de tipo sanguícola e as amastigotas intracelulares, enquanto que nos hospedeiros invertebrados e em meios de cultivo predomina a forma epimastigota, que passa depois a tripomastigota metacíclico (REY, 2001; NEVES 200).

A forma tripomastigota sanguícola é encontrada no sangue periférico de mamíferos demonstrando nítido polimorfismo, não se reproduz, pode ser fagocitada ou invadir os mais diversos tecidos. A forma amastigota intracelular apresenta a importante característica de capacidade de recuperação de multiplicação, através de divisões binárias. Por volta de 12 horas antes de romperem as células hospedeiras se transformam novamente em tripomastigotas, assegurando, assim, a continuidade da infecção no hospedeiro vertebrado (REY, 2001).

O ciclo de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* se inicia no hospedeiro invertebrado, quando este suga o sangue periférico de vertebrado contendo as formas tripanossômicas. No intestino do hemíptero, estas formas regridem a

epimastigotas que encontram na porção posterior do intestino médio um ambiente muito favorável que promove a infecção do inseto por toda sua vida. Outra forma de regressão é a esferomastigota que aparentemente possui capacidade de evoluir diretamente para a forma de tripomastigota metacíclico ao chegar à ampola retal do inseto. Esta última forma evolutiva ao ser eliminada nas fezes do inseto irá invadir o hospedeiro vertebrado permitindo, assim, que se feche o ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (REY, 2001; NEVES, 2000). Apresenta-se na figura 2 o ciclo evolutivo do parasita.

Outras formas de disseminação da doença são a transmissão congênita e através de transfusão de sangue contaminado. A transmissão congênita contribui de forma reduzida para o aumento de número de casos, porém subestima-se a importância da transmissão materna da Doença de Chagas nas regiões endêmicas. Estudos mostraram que em crianças de baixa idade o prognóstico pode ser muito preocupante podendo resultar facilmente em morte devido ao ataque agudo ao coração e ao sistema nervoso (REY, 2001; WENDEL *et al*, 1992; NEVES, 2000).

Figura 2: Representação esquemática do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: www.who.int/tdr/diseases/chagas/images/lifecycle.gif,
acessado em 09/2002.

A transmissão transfusional da doença é de importância significativa em saúde pública sendo o segundo fator de importância epidemiológica. Estima-se que somente na cidade de São Paulo cerca de 500.000 transfusões sejam realizadas anualmente (WENDEL *et al*, 1992). Se 2% dos doadores forem

portadores do *Trypanosoma cruzi* pode-se esperar que de 1000 a 2000 novos casos de infecção chagásica irão surgir anualmente. Com isso, torna-se evidente a necessidade contínua de controle de qualidade nos bancos de sangue, além de rigorosa seleção de doadores (WENDEL *et al*, 1992).

3.1.2 – Epidemiologia e aspectos sociais

O *Trypanosoma cruzi* faz parte de um ecossistema exclusivamente americano, sendo encontrado em extensas áreas deste continente abrangendo desde o sul dos EUA até o sul da Argentina e Chile, figura 3. Estima-se que 100.000 imigrantes infectados transportam a doença para território dos EUA (TORTORA *et al*, 2000). Na América Central todos os países têm sua população afetada em maior ou menor grau, atingindo tanto as planícies litorâneas como as regiões planálticas. As áreas endêmicas conhecidas tendem a crescer à medida em que avançam os estudos epidemiológicos, sendo que na América do Sul a endemia demonstra extrema importância (WHO, 2002; REY, 2001).

A incidência desta endemia está relacionada com o nível sócio-econômico da região e, em particular, à existência de vetores domiciliares, além dos tipos precários de habitação das regiões rurais e das baixas condições de higiene de seus habitantes.

A marginalização do indivíduo chagásico pela sociedade é evidenciada principalmente quando, ao tentar exercer seu direito ao trabalho, tem este direito negado mesmo quando adequado à sua condição clínica, que quase sempre não é suficientemente avaliada, evidenciando a Doença de Chagas também como um grave problema social com sobrecarga aos órgãos de previdência social devido ao montante de aposentadorias precoces, nem sempre necessárias (NEVES, 2000).

3.1.3 – Terapêutica

Em várias doenças como malária, tuberculose e Doença de Chagas depara-se com um arsenal de fármacos muito limitado e/ou ineficiente, dificultando consideravelmente o tratamento dos pacientes. Cita-se ainda, como agravante, o surgimento de cepas resistentes aos poucos fármacos disponíveis (TDR, 2001). Estes problemas evidenciam a necessidade premente de introdução de novos candidatos a fármacos, tornando também muito previsível a continuidade desta necessidade no futuro.

Não existe, até o presente momento, tratamento específico preventivo ou curativo para a doença de Chagas crônica, sendo os medicamentos disponíveis úteis apenas na fase aguda e ainda assim com grandes limitações. Por este motivo, o controle da doença se limita à luta antivetorial, nas medidas para prevenir sua transmissão através dos bancos de sangue, na implantação de terapias medicamentosas de caráter sintomático e, em alguns casos intervenção cirúrgica (REY, 2001; WHO, 2002; NEVES, 2000).

Numerosas substâncias já foram ensaiadas, citando-se como compostos ativos frente ao *Trypanosoma cruzi* os 5-nitrofuranos, os nitroimidazóis, os nitrotiazóis e as 8-aminoquinolinas. O nifurtimox e o benznidazol têm revelado que a eficiência desses fármacos, em ensaios clínicos e laboratoriais, varia com a linhagem do parasita, refletindo sua diversidade genética. Estudos estão sendo realizados a fim de mapear o genoma do *Trypanosoma cruzi*, porém, a obtenção de informações úteis para o desenvolvimento de novos fármacos levará ainda vários anos (GELB *et al*, 2002).

Figura 3: Distribuição mundial da doença de Chagas. Fonte : <http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm>

O nifurtimox e benznidazol são mais eficientes quando aplicados em esquemas terapêuticos prolongados para manutenção de níveis plasmáticos duradouros e eliminação das formas sangüíneas até a exaustão das formas teciduais. O nifurtimox tem efeito supressivo na multiplicação parasitária na fase aguda da infecção, provocando queda da temperatura corpórea e acelerando o desaparecimento das outras manifestações clínicas (NEVES, 2000; REY, 2001).

3.1.4 – Ensaios de fármacos e candidatos a fármaco frente ao *Trypanosoma cruzi*

GONZÁLES-MARTIN *et al* (1998) testaram nifurtimox e alopurinol nanoencapsulados e observaram atividade maior que a dos fármacos não encapsulados frente à cepa de *Trypanosoma cruzi*, porém, o material encapsulador, polietilenoacrilato, um polímero sintético, apresentou atividade sobre o crescimento do microrganismo, colocando em questão o uso deste tipo de agente encapsulador e evidenciando a vantagem da utilização de polímeros naturais.

Pesquisas recentes apontam para o potencial de compostos capazes de inibir a biossíntese do esteroide endógeno no *Trypanosoma cruzi* provocando, assim, acúmulo de intermediários tóxicos e a depleção do esteroide. MOLINA *et al* (2001) obtiveram um índice de cura de 90% com a administração IV de nanoesferas de DO870, composto teste, em ratos. Estes autores observaram que nanoesferas contendo cetoconazol ou itraconazol se mostraram completamente ineficientes.

NAVARRO *et al* (2001) testando complexos de cobre ou ouro com clotrimazol ou cetoconazol obtiveram taxas de inibição de crescimento de formas epimastigotas *in vitro* entre 66% e 73%. Observaram também que o clotrimazol não complexado não apresentou nenhum efeito inibitório sobre o crescimento do parasita.

Há grande interesse acerca do entendimento e elucidação do metabolismo do parasita em questão, principalmente pelo fato destas informações fornecerem uma base muito ampla para o desenvolvimento de novos fármacos. Estas informações estão relacionadas, por exemplo, às enzimas que catalizam reações essenciais para a manutenção e sobrevivência do microrganismo.

Uma dessas enzimas é a tripanotiona-redutase (TR), um alvo para o desenvolvimento de fármacos, responsável pela proteção de ataque de radicais livres ao *Trypanosoma cruzi*. PAULINO *et al* (2002) realizaram testes *in vitro* envolvendo compostos derivados do anel 5-nitrofurânico e 5-nitrotiofênico a fim de determinar a atividade inibitória sobre esta enzima e sobre o crescimento do *Trypanosoma cruzi*. O composto mais ativo apresentou 95% de inibição na taxa de crescimento. A inibição da TR foi de 44% e alguns análogos não demonstraram atividade sobre o crescimento.

Outra enzima em estudo é a dihidrofolato-redutase (DHFR), enzima envolvida na síntese de DNA do parasito. ZUCCOTTO *et al* (2001) desenvolveram uma série de compostos a partir da análise de banco de dados de compostos químicos utilizando programas computacionais, a fim de testar a atividade destes sobre a enzima e em formas epimastigotas *in vitro*. Vários compostos mostraram-se ativos ampliando assim a possibilidade de planejamento de novos agentes tripanomicidas.

3.2 – Compostos Nitro-heterocíclicos

O grupo nitro, -NO₂, é considerado como um grupo “parasitóforo” (FOYE *et al*, 1995) sendo muito favorável para o desempenho da atividade antiparasitária em grande número de seus derivados incluindo, principalmente, os compostos furânicos, tiofênicos e tiazólicos. A ação quimioterapêutica dos nitro-compostos é consequência, basicamente, da sua redução à amina com alteração no fluxo fisiológico de elétrons, inativando enzimas responsáveis pela produção de energia celular, essencial para a manutenção bioquímica do microrganismo (FOYE *et al*,

1995). Apresenta-se, na figura 4, o grupo farmacóforo de compostos 5-nitro-heterocíclicos.

Figura 4: Grupo farmacóforo dos compostos nitro-heterocíclicos.

Milhares de derivados 5-nitro-heterocíclicos foram sintetizados desde a introdução dos compostos nitrofurânicos na terapêutica na década de 40 (DODD & STILLMAN, 1944), porém, somente poucos foram introduzidos efetivamente no mercado e, ainda assim, alguns destes foram proibidos em alguns países devido aos seus efeitos adversos e tóxicos como reações de hipersensibilidade e anemia hemolítica provocada nos indivíduos com deficiência da enzima G6PD. A principal utilização destes compostos ocorre no tratamento de infecções do trato geniturinário, do trato intestinal, de pele e de mucosas e alguns possuem efeitos antifúngico e antiprotozoário.

Os fármacos mais representativos deste grande grupo são o nitrofural, a nitrofurantoína, a nifuroxazida, a furazolidona, a furaltadona, a nifuraldezona e o nifurtimox, sendo o último citado o fármaco de escolha para o “tratamento” da Doença de Chagas ocasionada principalmente pelas cepas oriundas da Argentina e do Chile (FOYE *et al*, 1995).

CERECETTO *et al* (1997) sintetizaram uma série de 14 compostos derivados do nitrotiofeno e nitrofuraldeído, sendo que o último grupo citado apresentou a mesma potência *in vitro* que o nifurtimox.

Apesar dos compostos nitroderivados serem estudados há décadas, o seu exato mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, entretanto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas tendo como objetivo o esclarecimento deste mecanismo. VIODÉ *et al* (1999) sugeriram duas rotas possíveis para a bioativação dos compostos nitrofurânicos, que estão apresentados na figura 5.

Figura 5: Possíveis vias de bioativação dos compostos nitrofurânicos.

Adaptado de: VIODÉ et al/ Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem. Pharmacol.*, v. 57, n. 5, p. 549-557, 1999.

Na via metabólica anaeróbica o radical aniônico formado na primeira etapa é transformado em derivado nitroso. Em seguida, este é reduzido, gerando o derivado amínico. Na via metabólica aeróbica o radical aniônico reage com o oxigênio disponível formando radicais superóxido que são transformados em peróxido de hidrogênio, sendo essa reação superóxido dismutase dependente. Com o acúmulo de H_2O_2 há geração de radicais hidroxila que são altamente tóxicos à célula.

Compostos 5-nitrotiofilidênicos têm sido muito estudados já que a substituição do átomo de oxigênio por enxofre pode melhorar a atividade biológica em sistemas dependentes, principalmente, da lipossolubilidade.

Um destes sistemas, estudados por MASUNARI e TAVARES (2002), onde sintetizaram um grupo de compostos derivados do 5-nitro-2-tiofilideno e submeteram estes a ensaios microbiológicos frente à cepa MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) (3SP/R33), obtiveram resultados que sugerem que esses compostos possam vir a ser uma alternativa para tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* multi-resistente.

REZENDE *et al* (2002) estudaram uma série de derivados 5-nitrotiofênicos e identificaram alguns compostos mais ativos que a nifuroxazida, fármaco padrão, frente à cepa multi-resistente de *S. aureus*. A análise dos resultados demonstrou que a atividade antibacteriana é fortemente dependente da hidrofobicidade dos derivados testados

TEDLAOUTI *et al* (1991) testaram uma série de derivados 5-nitrotiofênicos contra *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *L. infantum*, *L. tropica* e *P. falciparum* que se mostraram ativos frente estes microrganismos. No entanto, nenhum composto foi mais ativo do que os fármacos usados como controles, no caso o metronidazol (*E. histolytica*, *T. vaginalis*), a pentamidina (*T. vaginalis*, *L. infantum*) e a cloroquina (*P. falciparum*) que normalmente são utilizados na terapia das infecções causadas por esses microrganismos.

3.3 – Microencapsulação

A primeira aplicação comercial em produtos industrializados da técnica de microencapsulação por coacervação foi realizada pela empresa norte-americana *National Cash Register Co.*, em 1954 (SHAHIDI & HAN, 1993). Esta empresa produziu o primeiro papel de cópia sem carbono utilizando esta tecnologia, a qual ficou restrita devido a pouca divulgação de informações que permitiriam a reprodução desta metodologia.

Entretanto nas duas últimas a literatura científica tem fornecido informações mais detalhadas em trabalhos onde uma grande variedade de classes terapêuticas como analgésicos, esteróides, vitaminas, sedativos e hipnóticos, agentes quimioterápicos, radiofármacos e antimicrobianos, tiveram, com sucesso, seus princípios ativos (por exemplo, ácido acetilsalicílico, progesterona, testosterona, fenobarbital, eritromicina, β -lactâmicos, doxorubicina, insulina-¹²⁵I etc) microencapsulados através da técnica de coacervação (LIN, 1984).

Existem vários tipos de estrutura física de microcápsulas, como as esferas mononucleares ou multinucleares e partículas irregulares multinucleares. Apresenta-se, na figura 6, algumas das estruturas físicas de microcápsulas.

Figura 6: Estrutura física de microcápsulas. A. Microesfera obtida por microencapsulação em que o princípio ativo está disperso na matriz de revestimento; B. Microesfera em que o princípio ativo está apenas envolvido pelo revestimento; À extrema direita está a representação de uma partícula irregular multinuclear.

Adaptado de: SOUSA, M.S.M. Revista Química e Derivados, n. 388, 2000.

3.3.1 – Técnicas de obtenção de microcápsulas

Microcápsulas são partículas com diâmetro da ordem de 1 a 5000 μ em que basicamente há a presença de núcleo revestido pelas mais diversas substâncias como, por exemplo, gelatina, gelatina e goma arábica, etilcelulose, nylon e silicone (LIN, 1984). O processo de microencapsulação envolve basicamente três etapas: formação da camada que envolve o material ativo, estabilização da cápsula formada e a liberação do conteúdo no momento desejado a uma velocidade de liberação controlada. Este processo tem a capacidade de preservar o princípio ativo em um estado finamente dividido e liberá-lo de acordo com a demanda. Numerosas técnicas têm sido desenvolvidas para a fabricação de microcápsulas e estão divididas em três grupos: métodos físicos, químicos e físico-químicos, tabela 1 (SHAHIDI & HAN, 1993).

A escolha da técnica deve levar em conta fatores econômicos, a sensibilidade do material do núcleo ao método, tamanho desejado da microcápsula, propriedades físico-químicas do núcleo e do revestimento e mecanismos de liberação. (SHAHIDI & HAN, 1993).

TABELA 1 – Principais técnicas de obtenção de microcápsulas

Métodos Físicos	Atomização Spray-Chilling Spray-Cooling Spray-Coating em leito fluidizado Extrusão Co-cristalização Liofilização
Métodos Químicos	Inclusão molecular Polimerização interfacial
Métodos Físico-químicos	Coacervação (separação em fase-aquosa ou em fase orgânica) Coacervação interfacial Lipossomas

Adaptado de: SHAHIDI, F., HAN, X. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, n.6, p. 501-547, 1993.

Uma das aplicações industriais mais importantes das propriedades interfaciais de complexos proteína-polissacarídeo é a formulação de microcápsulas e micropartículas. A microencapsulação resulta da habilidade desses complexos formarem revestimento sólido ao redor de partículas de emulsões e de sólidos. No caso das emulsões o polímero protéico se encontra na fase contínua, que contém agente emulsionante, e a fase descontínua é oleosa, local em que o composto a ser microencapsulado está dissolvido (aromas, fármacos, células). Após a adição do polissacarídeo e correção do pH a coacervação ocorre envolvendo as partículas oleosas e então se procede a secagem das microcápsulas. Este tipo de microencapsulação é conhecido como coacervação interfacial e tem a vantagem do material microencapsulado se encontrar somente no núcleo da microcápsula (SHAHIDI & HAN, 1993).

3.3.2 – Substâncias utilizadas como material de revestimento

O passo inicial para a microencapsulação é a escolha adequada do material de revestimento. Na literatura termos como “shell”, “wall”, “encapsulation matrix” ou “carrier” são empregados para se referir ao material de revestimento.

As principais propriedades que o material de revestimento deve possuir são: não reagir com o material do núcleo e não adsorver solventes ou outros materiais utilizados durante o processo de fabricação e isolamento das microcápsulas, ser capaz de encapsular o material permanecendo estável e, principalmente, ser técnica e economicamente viável. Na tabela 2 estão descritas as principais matérias-primas utilizadas na microencapsulação de fármacos e alimentos.

TABELA 2 – Matérias-primas utilizadas em microencapsulação

Carboidratos	Maltodextrinas, xarope de milho, dextran, ciclodextrinas
Derivados da celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose, nitrocelulose, acetilcelulose, acetato-ftalato de celulose
Gomas	Arábica, agar, alginato de sódio, carragena
Glicerídeos e óleos	Ceras, parafinas, diglicerídios, monoglicerídios, óleos vegetais
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina, hemoglobina, peptídeos

Adaptado de: SHAHIDI, F., HAN, X. Encapsulation of food ingredienets. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, n.6, p. 501-547, 1993.

3.3.2.1 Goma arábica

A goma-arábica ou acácia apresenta-se na forma de pó com coloração branca fracamente amarelada não apresentando cheiro ou sabor. Somente a partir de 1950 esta goma começou a apresentar ampla aplicação industrial e atualmente mais de 100 variações desta goma já foram descritas devido a sua diversidade em gênero e condições ambientais (DICKINSON, 2003). É um polissacarídeo complexo formado por agregados de açúcares e hemicelulose com massa molecular de aproximadamente 240.000 – 580.000. O agregado é constituído essencialmente por L-arabinose, D-galactose, L-ranose e ácido D-glicurônico, ligados a átomos de cálcio, magnésio e potássio e também há uma

pequena porcentagem (5%) de proteína responsável pela propriedade emulsificante desta goma (WADE & WELLER, 1994; STEPHEN, 1995). Apresenta-se na figura 7 a estrutura da cadeia principal da goma-arábica. Esta estrutura é formada principalmente por (1→3)- β -D-galactano e várias cadeias laterais de galactopiranosídeo, unidas mediante ligações β -(1→6), que por sua vez podem conter L-arabinose (DICKINSON, 2003). Uma outra propriedade muito peculiar desta goma é a sua viscosidade, pois mesmo em concentrações elevadas (40%) a sua solução apresenta uma baixa viscosidade e a maioria das outras gomas apresenta alta viscosidade em concentrações baixas (1%) impossibilitando sua aplicação em aparelhos de atomização (SHAHIDI & HAN, 1993; DICKINSON, 2003).

Figura 7: Estrutura da cadeia principal da goma arábica.

Fonte: ROBINSON, D.S. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Zaragoza, Editorial ACRIBIA S.A., 1991.

3.3.2.2 Gelatina

Gelatina é um termo genérico para a mistura de frações de proteínas purificadas obtidas a partir da hidrólise ácida (gelatina tipo A) ou alcalina (gelatina tipo B) de colágeno animal. Comercialmente podemos encontrar uma mistura desses dois tipos de gelatina em forma de folhas, flocos, tiras ou em pó de coloração variando entre o amarelado ao âmbar dependendo do tamanho da partícula. A sua massa molecular varia de 15.000 a 250.000 e o pH da solução aquosa a 1% p/v a 25 °C da gelatina tipo A varia entre 3,8-6,0 e para o tipo B está

entre 5,0-7,4 estando o valor de ponto iso-elétrico (pI) entre 7-9 e 4,7-5,3 para os dois tipos de gelatina, respectivamente. É praticamente insolúvel em acetona, clorofórmio, etanol, éter e metanol. Em água seu volume aumenta e se torna mole absorvendo de 5 a 10 vezes o seu peso em água (USP, 1992).

A gelatina origina emulsões do tipo O/A e trata-se de uma substância de fracas propriedades emulsivas. Suas soluções com concentração acima de 2% são muito viscosas e tornam-se sólidas a temperatura ambiente. A sua ionização pode ser visualizada no esquema abaixo, figura 8, proposto por GALLO citado por PRISTA (1992).

FIGURA 8: Ionização da gelatina.

Quando uma solução de gelatina é aquecida acima de 50 °C inicia-se a desnaturação da sua estrutura polimérica, diminuindo a resistência do gel e, ao atingir 80 °C, esta resistência diminui para a metade. Reage com aldeídos, polímeros catiônicos e aniônicos, eletrólitos, íons metálicos, conservantes e surfatantes (USP, 1992)

Uma grande vantagem do uso da gelatina como transportador de fármacos está relacionada à sua natureza eletroquímica que pode ser alterada de acordo com o processo de hidrólise do colágeno. A gelatina tipo B é obtida por hidrólise alcalina com rompimento de ligações amídicas resultando em produto com alta densidade de grupos carboxílicos, tornando a gelatina negativamente carregada causando diminuição do seu pI disponíveis no mercado. De forma oposta, a gelatina tipo A obtida pela hidrólise ácida, preserva mais as ligações amídicas do colágeno mantendo o pI da gelatina muito próximo ao do colágeno havendo,

desta forma, gelatinas com vários pI . Assim, planejando-se a liberação de um fármaco ou substância de caráter ácido é preferível a utilização da gelatina alcalina ($pI = 9,0$), enquanto que para fármacos alcalinos, utiliza-se a gelatina ácida ($pI = 5,0$) (TABATA & IKADA, 1998). Na figura 9 podemos visualizar a obtenção das gelatinas ácida e alcalina.

FIGURA 9: Processo de obtenção da gelatina ácida e básica a partir do colágeno.
(Adaptado de TABATA & IKADA, 1998)

3.3.3 – Mecanismos de liberação dos princípios ativos

A liberação do material revestido, que pode ser um fármaco, depende de fatores como a umidade, pH , forças físicas do meio, como agitação e principalmente da natureza e espessura da parede de revestimento (PRISTA, 1992).

Os principais mecanismos de liberação são: por fratura, quando o revestimento é fragmentado ou quebrado, por difusão quando o revestimento funciona como uma membrana semipermeável respeitando o gradiente de concentração, por solubilização do revestimento, por biodegradação, quando o

revestimento tem afinidade por alguma enzima ou rota bioquímica ou quando há a quebra da ligação fármaco-polímero (SHAHIDI & HAN, 1993).

O contato das micropartículas com solventes e/ou fluidos biológicos ativa a liberação do fármaco que encontra-se aprisionado por cadeias poliméricas. As regiões externas do polímero intumescem seguido da saída do fármaco. A difusão é o mecanismo de liberação mais comum. Desta forma o fármaco migra de uma posição inicial no sistema polimérico para a superfície externa e depois para o meio ambiente. Este fenômeno ocorre tanto em micropartículas que possuem um reservatório central, cercado pelo polímero, como em matrizes onde o fármaco é uniformemente distribuído no polímero (SHAHIDI & HAN, 1993).

3.3.4 – Microencapsulação pela técnica de coacervação

Misturas aquosas de biopolímeros podem ser instáveis ocasionando a separação de fases e são classificadas em dois tipos: No primeiro deles a interação entre os biopolímeros é de caráter repulsivo e o sistema forma duas fases, sendo cada uma delas rica em um dos biopolímeros. Torna-se claro, portanto, que as interações biopolímero-solvente são favorecidas em detrimento da interação biopolímero-biopolímero e solvente-solvente. No segundo tipo a interação é atrativa e o sistema também apresenta duas fases, porém, os biopolímeros presentes estão apenas em uma das fases. O primeiro tipo de separação de fases é normalmente chamado de incompatibilidade termodinâmica, enquanto que o segundo tipo se refere à coacervação complexa. O fenômeno de coacervação resulta de interações fracas e não específicas (eletrostáticas, van der Waals, hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio) entre os biopolímeros possibilitando a formação de complexos solúveis e/ou insolúveis. Com a combinação dos biopolímeros os complexos formados têm suas propriedades funcionais implementadas como, por exemplo, suas propriedades de superfície (SHAHIDI & HAN, 1993).

Uma das grandes vantagens da técnica de coacervação está relacionada às condições brandas em que o processo ocorre bem como ao fato de não

necessitar, na maioria das vezes, de solventes orgânicos, condições especiais para a manipulação de substâncias protéicas, como enzimas, células e compostos farmacologicamente ativos (SHAHIDI & HAN, 1993).

3.3.4.1 – Coacervação simples

O processo de microencapsulação por coacervação simples apresenta dificuldades para o isolamento e recuperação das microcápsulas durante o processo de fabricação devido às muitas interações do polímero com o solvente. Outro problema é o fato do material de revestimento necessitar ser solidificado por diversas substâncias químicas incompatíveis com finalidades farmacêuticas que se internalizam com o revestimento (PRISTA *et al*, 1992).

Este processo se inicia com espécies coloidais que se agregam para formar núcleos submicroscópicos que coalescem para formar gotas microscópicas. A coalescência posterior produz gotas macroscópicas que tendem a separar-se em uma fase contínua. Se, anteriormente a coacervação, um material imiscível em água como óleo, é disperso na forma de gotas diminutas na solução aquosa do material encapsulador e, então, uma certa quantidade de uma base ou um ácido é adicionado para induzir a coacervação, o material coloidal encapsulador forma ao redor de cada gota de óleo um revestimento líquido. Para produzir microcápsulas de paredes sólidas esse revestimento deve ser solidificado (SHAHIDI & HAN, 1993).

A mistura de um biopolímero em solução com um solvente incompatível, como por exemplo, etanol, isopropanol, polietilenoglicol (PEG) ou óxido de polietileno (PEO) causa também a separação de fases. Em solução esses agentes desidratantes promovem a interação biopolímero-biopolímero. A coacervação simples é um fenômeno dependente de parâmetros como pH, força iônica, temperatura e estrutura molecular dos biopolímeros. KHALIL *et al* (1968) demonstraram a importância das moléculas de gelatina apresentarem-se em forma compacta, semelhante a uma esfera, para a coacervação simples ocorrer. Essa conformação pode ser obtida com valores de força iônica baixos e resulta de

atrações intramoleculares resultantes do balanço de carga que ocorre no ponto isoelétrico. Fora desta faixa de valores as interações são repulsivas causando apenas compactação parcial da molécula favorecendo a acessibilidade do solvente ao biopolímero e, assim, alterando o processo de coacervação. Similarmente, a adição de sais diminui as forças atrativas inter/intramoleculares, bloqueando ou isolando os grupos funcionais carregados (KHALIL *et al*, 1968).

3.3.4.2 – Coacervação complexa

A coacervação complexa é a separação espontânea em um sistema líquido/líquido que ocorre quando colóides carregados positivamente e negativamente se polimerizam como resultado das atrações eletrostáticas. A coacervação complexa é muito vantajosa, pois, é uma das poucas técnicas que pode ser aplicada utilizando polímeros naturais, um dos principais pré-requisitos no processamento de alimentos e medicamentos, é extensamente descrita na literatura e o complexo formado entre os polímeros diminui consideravelmente a interação deste complexo com o solvente do meio, facilitando muito a recuperação das microcápsulas.

Uma desvantagem dessa técnica é a exigência do controle de diversas variáveis como temperatura, pH, concentração dos colóides utilizados e, se for o caso, a concentração de eletrólito utilizado, já que a coacervação ocorre somente em uma determinada faixa de pH, temperatura e concentração dos colóides. Ressalta-se, porém, com a padronização da metodologia essas variáveis são estabelecidas e controladas. (REMUNÁN-LOPEZ *et al*, 1996).

Na coacervação complexa considera-se a mistura de dois ou mais biopolímeros e um solvente. No caso de biopolímeros eletrostaticamente compatíveis, ou seja, que apresentarem cargas opostas, estes interagem e concentram-se em uma fase pobre em solvente, ao passo que o solvente forma uma fase praticamente isenta em biopolímero, Figura 10. Este caso de separação de fases foi descrito por BUNGENBERG DE JONG (1949) considerando o sistema goma arábica-gelatina.

FIGURA 10: Representação esquemática da formação de coacervado com indicação das microcápsulas formadas.

A principal interação entre biopolímeros é de caráter eletrostático, depende, portanto, do pH e força iônica do sistema. Assim, a carga das moléculas é o fator que mais afeta a coacervação complexa e a menos que os dois biopolímeros apresentem cargas opostas, a coacervação não ocorre. Isso implica que a densidade da carga na molécula também é crítica. Esta densidade pode ser definida como sendo o número de cargas presentes no biopolímero por unidade de área.

A coacervação é suprimida em densidades muito baixas, devido a escassez de ligações, ou muito altas, devido a maior probabilidade de formação de complexos solúveis. O rendimento máximo de coacervado é obtido quando a mistura das biomoléculas é estequiométrica, porém com cargas opostas. A coacervação também é suprimida em altas concentrações de sais que formam uma camada densa ao redor das moléculas, prevenindo interações eletrostáticas (BUNGENBERG de JONG, 1949).

A natureza das interações entre proteínas e polissacarídeos na formação de complexos pode ser dividida em fraca ou forte, específica ou não e repulsiva ou atrativa (DICKINSON, 1993). Interações repulsivas são sempre não-específicas, de duração transitória, possuem origem eletrostática e tendem a serem fracas. Estas Interações podem ser encontradas em misturas de proteínas

com polissacarídeos não-iônicos ou entre polissacarídeos aniônicos com proteínas, em que o pH do sistema esteja acima do pI da proteína.

Interações atrativas podem ser fracas ou fortes e ainda específicas ou não, por exemplo, uma ligação covalente entre proteínas e polissacarídeos é uma interação específica, forte e permanente (STAINSBY, 1980). As interações atrativas não-específicas envolvem grupos com características iônicas, hidrofóbicas e com capacidade de fazer ponte de hidrogênio e ligações do tipo *van der Waals*. Interações atrativas fortes podem ocorrer entre proteínas positivamente carregadas ($\text{pH} < \text{pI}$) e polissacarídeos aniônicos em presença de baixa força iônica. Atrações fracas surgem entre proteínas não carregadas ($\text{pH} = \text{pI}$) ou negativamente carregadas ($\text{pH} > \text{pI}$) e polissacarídeos aniônicos.

Dois tipos de complexos podem ser produzidos através de interações eletrostáticas. Complexos solúveis são obtidos quando as cargas opostas dos biopolímeros não estão matematicamente balanceadas, assim, as cargas residuais permitem interação com as moléculas do solvente. Caso as cargas opostas dos dois biopolímeros estiverem estequiometricamente equilibradas a carga I do complexo é zero e este se torna insolúvel (TOLSTOGUZOV, 1997).

Estudos demonstram que baixas temperaturas favorecem a complexação entre proteínas e polissacarídeos devido a formação de pontes de hidrogênio (ANTONOV *et al*, 1996; BRAUDQ & ANTONOV, 1993).

As interações hidrofóbicas são influenciadas pela variação na entropia do sistema e são estimuladas pelo aumento da temperatura que modifica a conformação e, em alguns casos, até mesmo a estrutura dos biopolímeros (STAINSBY, 1980).

A ligação covalente é uma interação altamente específica e com caráter não eletrostático. Este tipo de interação surge da reação química entre grupos amínicos da proteína e grupos carboxílicos do polissacarídeo, resultando, assim em ligação amídica muito forte. Esta é favorecida pela desidratação do complexo, por exemplo, pelo calor, liofilização ou álcoois. Assim, a ligação covalente é um

meio prático de estabilizar o complexo formado, tornando-o irreversível frente a variações de pH e força iônica (STAINSBY, 1980; HILL & MITCHELL, 1995).

A concentração de íons H^+ e OH^- exerce grande influência na formação de coacervados já que alteram diretamente o grau de ionização dos grupos funcionais $-NH_2$ e $-COOH$ presentes nos biopolímeros. Assim, o rendimento máximo de coacervado é obtido com pH abaixo do pI da proteína.

DANIELS & MITTERMAIER (1995) realizaram estudo considerando o efeito do ajuste do pH na formação do complexo gelatina-goma arábica utilizando cinco diferentes ácidos (ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido acético e ácido cítrico). Concluiu-se que o rendimento máximo de coacervado foi observado no mesmo valor de pI (3,8) para todos os ácidos utilizados e que o rendimento foi de 82% para todos esses sistemas, com exceção do ácido sulfúrico que apresentou rendimento de 79%. O autor atribuiu esta diferença ao resultado do comportamento dos íons sulfato no valor de pI= 3,8, que interagem com a gelatina positivamente carregada, diminuindo a interação da goma-arábica com a gelatina.

3.3.4.2.1 – Descrição teórica da coacervação complexa

A modelagem teórica da coacervação complexa é necessária tanto para melhor compreensão das bases dos mecanismos envolvidos na separação de fases como para prever o comportamento da estabilidade de sistemas compostos por polímeros de acordo com a variação de propriedades físico-químicas e parâmetros estruturais. Até o momento, quatro teorias foram propostas, e são elas: Teoria de Voorn-Overbeek, Teoria de Veis-Aranyi, Teoria de Nakajima-Sato e Teoria de Tainaka. Apesar de nenhuma dessas teorias ser abrangente o suficiente para explicar o fenômeno da coacervação complexa em todos os tipos de sistemas, elas fornecem várias informações para o melhor entendimento do fenômeno em questão (BURGESS *et al*, 1991).

A Teoria de VOORN-OVERBEEK (1957) é baseada nos resultados obtidos por BUNGENBERG DE JONG (1949) para o sistema gelatina-goma arábica. De acordo com esses autores a coacervação é um fenômeno espontâneo, resultado

da competição entre forças eletrostáticas atrativas, estabilizando a interação biopolímero-biopolímero, e de efeitos de entropia que tendem a anular essa interação. As cadeias dos dois biopolímeros se associam formando a fase do coacervado “aprisionando” moléculas do solvente nesta fase. A presença do solvente contribui para o aumento da entropia do sistema, possibilitando os mais variados arranjos entre as macromoléculas, assim, o coacervado é tido como um líquido que pode ser revertido ao seu estado inicial.

Esta teoria possui os seguintes postulados: as interações soluto-solvente são negligenciadas, as cargas estão distribuídas em todas as partes da solução, embora estejam localizadas nas cadeias do polímero e as cadeias dos polímeros assumem conformação de espiral. OVERBEEK & VOORN (1957) determinaram valores limites para a densidade de carga (σ) e massa molecular (r) que polímeros devem ter para que seja possível a ocorrência da coacervação. Para sistemas de dois componentes, por exemplo, água e gelatina, $\sigma^3 r$ deve ser maior ou igual a 0,53 e para sistemas com três ou quatro componentes esse valor é corrigido para 1,06.

A Teoria de VEIS-ARANYI (1960) é baseada na coacervação complexa entre gelatinas de cargas opostas em condições que respeitem $\sigma^3 r < 0,53$, ou seja, quando a Teoria de Voorn-Overbeek não se aplica, sendo conhecida como “dilute phase aggregate model” e não é limitada pelos postulados da Teoria de Voorn-Overbeek. Este modelo considera a coacervação como processo de duas etapas, em que, inicialmente ocorre a agregação espontânea dos polímeros de cargas opostas, após agitação, devido a interação eletrostática formando agregados com conformação de baixa entropia. Estes agregados vão se organizando de forma lenta, processo que pode levar horas ou até dias para formar a fase de coacervado.

BURGESS e CARLESS publicaram em 1985 e 1986 trabalhos que confirmaram o processo de duas etapas proposto por Veis-Aranyi para sistemas gelatina-gelatina, detectando a presença de pequenos agregados através da técnica de espalhamento de luz. Em outro estudo SINGH & BURGESS (1989)

descrevem a coacervação após a mistura de albumina e ácido algínico com cargas opostas e ressalta-se que o sistema em questão se mostrou bastante ajustado à Teoria de Veis-Aranyi.

A Teoria de NAKAJIMA-SATO (1972) é baseada em sistema de polímeros sintéticos cujas macromoléculas possuem alta densidade de cargas. Esta teoria inclui o parâmetro denominado "*Huggins*" de caráter eletrônico e o termo eletrostático σ^3r calculado para este sistema, de acordo com a equação de OVERBEEK & VOORN (1957), é muito menor que o valor proposto anteriormente por esses mesmos autores (0,025 contra 0,53). No entanto, os autores concordam com a distribuição uniforme das cargas na fase diluída e concentrada.

A Teoria de TAINAKA (Tainaka, 1979; Tainaka, 1980) é o modelo mais recente desenvolvido para a coacervação complexa e pode tanto ser aplicada para o sistema gelatina-goma arábica como albumina-goma arábica. Tainaka concorda com a Teoria de Veis-Aranyi no que se refere à formação dos agregados a partir dos pares de cátions e ânions na fase diluída. De acordo com Tainaka na fase concentrada os agregados se sobrepõem resultando em ganho de energia eletrostática oriunda da alta densidade de cargas localizadas nos pontos de sobreposição. Assim, a separação de fases está relacionada a fatores eletrostáticos atrativos que são intensificados com o aumento da massa molecular e a densidade de carga das macromoléculas. Essa teoria explica a auto-supressão da coacervação em altas concentrações de biopolímeros devido a estabilização dos agregados formados inicialmente, impossibilitando o seu rearranjo para a formação do coacervado.

3.3.5 – Secagem por atomização

A conversão extremamente rápida do material úmido para a forma seca e a baixa temperatura envolvida durante este processo de secagem são características muito importantes para a secagem de materiais sensíveis como vitaminas, antibióticos, hormônios e enzimas (RÉ, 1998).

Quando a solução ou suspensão contendo o material a ser seco é introduzida no atomizador e alcança o disco rotativo, o qual, opera em altas revoluções, provocando o aumento da superfície do líquido em até 1000 m² por litro, o material arremessado para a câmara de secagem encontra-se sob forma de névoa. O ar aquecido é continuamente misturado com este névoa causando evaporação quase instantânea do solvente.

Há diversos tipos de secadores por atomização que diferem no tamanho, forma e tipo de atomização. A atomização normalmente é obtida através de bocal de pressão ou por disco rotativo (figura 11). Os atomizadores de disco rotativo têm a vantagem de operar com líquidos de maior consistência e/ou abrasivos. Na maioria dos projetos deste tipo de secador usa-se sistema concorrente, ou seja, o líquido a secar e o escoamento do ar possuem a mesma direção. Desta forma o produto a ser seco não fica exposto a temperaturas elevadas possibilitando a secagem de substâncias termolábeis.

Durante o processo de secagem a água é evaporada, porém, substâncias voláteis como aromas ou óleos essenciais são quase completamente retidos nas micropartículas, ao contrário do que se poderia supor. A água presente na superfície das gotículas evapora-se rapidamente formando uma membrana semipermeável, muito pouco permeável aos compostos aromáticos, porém, permanece permeável para as moléculas de água, que possuem volume e peso muito menores (RÉ, 1998).

Figura 11 : Diagrama esquemático de secador por atomização com disco centrífugo.

Adaptado de: MASTERS, 1972

3.3.6 – Emprego de microcápsulas obtidas por coacervação complexa

A gelatina e a goma arábica vêm sendo utilizadas há décadas no preparo de microcápsulas. Em um primeiro momento, sua utilização estaria relacionada ao fato de serem as principais matérias-primas disponíveis e aplicáveis para esta técnica e atualmente pelos motivos de fácil acesso e ausência de efeitos tóxicos.

BURGESS *et al* (1991) estudaram um sistema constituído de albumina e goma arábica testando várias condições de trabalho a fim de otimizar o processo de microencapsulação fornecendo assim dados úteis como pH e força iônica ótimos para rendimento máximo de coacervado.

DONG & ROGERS (1993) realizaram trabalho *in vitro* na área de microencapsulação. Vetores conhecidos como lipossomas, constituídos principalmente de material lipídico, dificilmente são administrados por via oral

visto que as condições fisiológicas do estômago facilmente os destruiriam. Estes autores microencapsularam lipossomas contendo ácido acetilsalicílico com o sistema goma arábica e gelatina, demonstrando o potencial desse sistema de vetorização de fármacos.

REMUNÁN-LÓPEZ *et al* (1996) investigaram o sistema quitosana e gelatina utilizando como material de núcleo um dos seguintes fármacos: clorofibrato, piroxicam ou sulfametoxazol. Os bons resultados obtidos demonstraram a aplicabilidade do método para encapsular vários fármacos.

AMIET-CHARPENTIER *et al* (1998) exploraram o potencial do sistema gelatina e Hexatren[®], um polifosfato, com o intuito de vetorizar bactérias em sementes de soja e tomate, a fim de melhorar o crescimento e proteção dessas plantas.

ICHWAN *et al* (1999) determinaram a aplicabilidade do sistema goma arábica e gelatina em formulações tópicas para a benzocaína e os testes *in vitro* demonstraram que a liberação lenta do princípio ativo pôde garantir efeito prolongado do fármaco.

SANCHES & RENARD (2002) estudaram a estabilidade e a estrutura de microcápsulas com o sistema goma-arábica e β -lactoglobulina. Concluíram que agregados de proteína afetam a coacervação por efeitos de entalpia e entropia.

Nota-se, portanto, que a microencapsulação é uma tecnologia de ampla aplicação, e devido a sua grande versatilidade, esta se ajusta as mais diversas necessidades, possibilitando novos estudos relacionando o desempenho de compostos microencapsulados em sistemas onde estes mesmos compostos, na sua forma pura, já foram estudados.

4 – *Parte Experimental*

4.1 – Matérias-primas e equipamentos

- 5-nitro-2-furfurilideno 4-benzidrazidas substituídas (obtidas por TAVARES *et al*, 1997);
- Benznidazol 97%, doado gentilmente pela Roche Brasil;
- Gelatina em pó Tipo B (Bloom 250), doada gentilmente pela Gelita do Brasil Ltda;
- Goma arábica em pó (Botica ao veado d'ouro, lote 02J018);
- Água deionizada Milli-Q;
- Ácido clorídrico P.A., Merck;
- Formaldeído solução comercial a 37%, Synth;
- Dimetilsulfóxido P.A., Synth;
- Agitador magnético com aquecimento;
- Agitador mecânico com controle de rotação e tempo;
- Manta de aquecimento Fisaton modelo 102;
- pHmetro Hanna *Instruments* – HI-8424;
- Rotaevaporador Fisatom Mod. 802;
- Atomizador Anhydro A/S rotativo modelo CC-63;
- Balança analítica OHAUS AS200S;
- Microscópio óptico Olympus BX 60 com câmera digital;
- Centrífuga Tecnal LS-3-Plus;
- Pipetas automáticas Gilson modelos P1000, P5000, P200 e P20;
- Espectrofotômetro de Ultravioleta Beckman Coulter DU-640;
- Vidraria Pyrex;
- Bomba peristáltica Milan[®] modelo 202.

4.2 – Métodos

4.2.1 – Ensaios preliminares para a microencapsulação

Misturou-se a uma solução de 50 mL de gelatina a 1, 2 ou 3% a 40±2°C uma solução de goma arábica de igual concentração, temperatura e volume. Agitou-se por 30' a 330 rpm. Ajustou-se o pH do sistema com solução diluída de

ácido clorídrico até pH 3,0, 3,5 ou 4,0 e agitou-se a mistura por mais 30'. Ocorreu, desta forma, a coacervação do sistema, o qual foi resfriado em banho de gelo (5 °C) durante 30' sob agitação contínua. Em seguida o sistema foi seco por uso de álcoois. Pequenas amostras foram retiradas para análise microscópica com o objetivo de confirmar a formação das microcápsulas.

4.2.2 – Técnica de microencapsulação

Sob agitação constante (1200 rpm/30') 50 mg do nitro composto foram suspensos em 50 mL de água a 40 ± 2 °C. Em seguida diminuiu-se a velocidade de agitação (330 rpm) e adicionou-se quantidade suficiente de gelatina para obter concentração de 2% e solução de goma arábica de igual concentração, temperatura e volume. Agitou-se por 30'. Ajustou-se o pH do sistema com solução diluída de ácido clorídrico até pH 3,5 e agitou-se a mistura por mais 30'. Ocorreu, desta forma, a coacervação do sistema o qual foi resfriado em banho de gelo (5 °C) durante 30' sob agitação contínua.

Em seguida o sistema foi centrifugado (500 rpm/1') e o sobrenadante foi recolhido e seco. Pequenas amostras foram retiradas para análise microscópica com o objetivo de confirmar a formação das microcápsulas. Apresenta-se na figura 12 e 13, respectivamente, a aparelhagem e fluxograma para obtenção das microcápsulas.

FIGURA 12: Aparelhagem utilizada na obtenção de microcapsulas.

FIGURA 13: Fluxograma para a obtenção das microcápsulas de derivados nitro-heterocíclicos.

4.2.3 – Secagem das microcápsulas

Empregou-se dois métodos de secagem, a saber: álcoois com auxílio de pentóxido de fósforo e atomização.

4.2.3.1 – Secagem com álcoois

Após a transferência do coacervado para béquer de 300 mL com agitação magnética por 20', adicionou-se 150 mL de isopropanol 70%. Decorrido este tempo mantém-se o sistema em repouso, removendo parcialmente o álcool sobrenadante com pipeta. Iniciou-se novamente a agitação por 20' com adição lenta de 200 mL de etanol absoluto com auxílio de funil de separação. Removeu-se novamente o álcool e adicionou-se nova porção de 150 mL de etanol absoluto. Em seguida, as microcápsulas foram filtradas e dessecadas em presença de pentóxido de fósforo até peso constante.

4.2.3.2 – Secagem por atomização

Na secagem por atomização o coacervado foi transferido para béquer de 1200 mL, pois, aumentou-se em 10 vezes o volume para as amostras preparadas para esta técnica mantendo-se as proporções iniciais de gelatina, goma arábica e nitro composto. O sistema foi mantido em banho de gelo sob agitação magnética e com auxílio de bomba peristáltica foi introduzido no atomizador com velocidade de 10 mL/min. O ar de entrada e saída foram ajustados para 150 ± 10 °C e 85 ± 5 °C respectivamente. As amostras secas foram analisadas por microscopia óptica.

Antes da determinação da concentração dos compostos microencapsulados foram realizados três ensaios preliminares: avaliação da interferência do material de encapsulação (complexo gelatina-goma arábica) sobre a absorção dos nitro compostos pela verificação da sua absorção na faixa do UV-VIS (200 a 750 nm), determinação do valor de absorção máxima de cada composto no UV por meio da obtenção de curva de absorção (200 a 750 nm) e construção das respectivas curvas de calibração.

FIGURA 14: Esquema do aparelho do atomizador utilizado neste trabalho e detalhe do disco rotativo do atomizador.

(adaptado de: documentação do aparelho)

4.2.4 – Análise microscópica

Para confirmar a formação das microcápsulas com ausência e presença dos nitro compostos empregou-se técnica de microscopia óptica. Com pipeta de Pasteur pequenas amostras foram retiradas, após a centrifugação do sistema, e colocadas em câmara de Neubauer sendo analisadas sob aumentos de 400x e 800x. As amostras secas também foram analisadas e todas as imagens foram fotografadas. Os retângulos menores da câmara de Neubauer foram utilizados para avaliação do diâmetro das partículas (fotos das figuras 19 a 34). Cada retângulo possui lados de 50 μm .

4.2.5 – Avaliação da interferência do material de encapsulação

Para este ensaio triturou-se 200 mg de microcápsulas secas obtidas de acordo com o método descrito no item 4.2.1 com ausência dos nitro compostos. A seguir, foram preparadas duas suspensões em DMSO com concentrações de 5,0 e 2,5 mg/mL de pó triturado de microcápsulas em tubos de centrifuga. Os tubos foram agitados, aquecidos até 50 °C por 30', agitados novamente, centrifugados a 3500 rpm por 5' e a absorbância do sobrenadante foi determinada. Alíquota de DMSO puro foi utilizada como branco.

4.2.6 - Obtenção das curvas de absorção no UV-VIS

A quantidade de composto microencapsulado foi avaliada por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta. Obteve-se a curva de absorção dos nitro compostos entre 200 e 750 nm possibilitando determinar o comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$).

4.2.7 – Construção das curvas de calibração

Realizou-se a construção das curvas de calibração a partir dos valores de absorção no $\lambda_{\text{máx}}$, determinados no item anterior. Essas curvas foram obtidas a partir dos valores de absorção de sete soluções de concentração conhecidas. As soluções dos nitro compostos, em DMSO, foram preparadas a partir de solução mãe de concentração 0,25 mg/mL. Alíquotas de 0,10, 0,20, 0,25, 0,40, 0,50, 1,00, e 1,20 mL foram transferidas e diluídas em balões volumétricos de 10 mL. A seguir obteve-se as absorbâncias das soluções calibradoras gerando equações (item 5.6) que possibilitaram a conversão dos valores de absorção em massa.

4.2.8 – Dosagem dos nitro compostos microencapsulados e porcentagem de microencapsulação

Triturou-se as microcápsulas obtidas pesando-se, em seguida, amostras de 5,0 e 2,5 mg. Adicionou-se 5 mL de DMSO em cada amostra e agitou-se o

sistema por 5'. Colocou-se os tubos em banho de água a 50 °C por 30', agitando-os novamente por mais 5'. Em seguida estes foram centrifugados a 3500 rpm por 5'. O processo de dosagem do sobrenadante foi realizado em UV. As amostras foram preparadas em triplicata e uma alíquota de DMSO puro foi utilizada como branco.

Com os valores de absorbância obtidos e a partir da equação gerada pela curva de calibração (item 5.6) obteve-se a concentração de nitro composto em μM . Em seguida, aplicou-se a equação da Molaridade convertendo este valor massa (μg). Obteve-se, assim, a relação massa microcápsulas: massa nitro composto (μg) para as duas amostras pesadas anteriormente (5,0 e 2,5 mg). O valor desta relação foi usado no ensaio biológico dos produtos microencapsulados.

A partir do valor do rendimento de microcápsulas obtido para cada produto (tabelas 7 a 14) aplica-se regra três entre este valor e a relação obtida anteriormente. Este novo valor obtido, M, é comparado com a massa inicial de nitro composto adicionada no sistema (item 4.2.2) e assim se obtém a porcentagem de microencapsulação, equação 1.

$$\% \text{ Microencapsulação} = \frac{100 \cdot M}{\text{Massa inicial de nitro composto}} \quad (\text{Equação 1})$$

4.2.9 – Ensaio biológicos *in vitro* dos nitro compostos frente a *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios biológicos frente à cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, isolada por Silva e Nussenzweig, 1953, foram realizados com o auxílio da mestre Marinei Ferreira Gonçalves, no Laboratório de Bioquímica de Parasitas da Professora Titular Maria Júlia Manso Alves do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.2.9.1 – Meio de cultura

O parasito foi cultivado em meio LIT (*liver infusion tryptose*). Este meio é composto por NaCl 0,4%, KCl 0,04%, Na₂HPO₄ 0,8%, glicose 0,2%, triptose 0,5%, infusão de fígado 0,5% (as porcentagens são expressas em peso/volume). Esta mistura é enriquecida com 10% de soro bovino (v/v), o pH é ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio é incubado a 68 °C por 1 hora. Após resfriamento até temperatura ambiente, adiciona-se solução de hemoglobina bovina para obter concentração final de 2% (v/v). A esterilização do meio é realizada por filtração em membrana Millipore 0,22, em seguida o meio é distribuído em frascos de vidro e estocados a 4 °C até sua utilização.

4.2.9.2 – Condições de cultivo

Os compostos nitro derivados e benznidazol, utilizado como fármaco de referência, foram dissolvidos em DMSO e diluídos em meio de cultura LIT de modo obter concentração de 50 µg/mL. O sistema foi incubado à 37 °C e a concentração final de DMSO foi 5%. Utilizou-se inóculo de 20.10⁶ células/mL (provenientes de culturas de 72 horas). A atividade tripanomicida *in vitro* foi medida através da contagem em câmara de Neubauer de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após 24, 48 e 72 horas. Foi avaliada a influência do solvente (DMSO 5%) e de microcápsulas sem nitro composto secas no atomizador e por álcoois frente ao desenvolvimento do parasita após 24, 48 e 72 horas. Os compostos microencapsulados foram ensaiados nas mesmas condições, porém foram reidratados em água estéril (100 µL) antes da adição do meio de cultivo e a contagem das formas parasitárias foram realizadas até o 7º dia. Todos ensaios foram realizados em triplicata.

5 – Resultados e Discussão

5.1 – Ensaios preliminares para a microencapsulação

Com a finalidade de obter informações sobre o desempenho da metodologia empregada para a microencapsulação dos nitro compostos realizou-se ensaios para avaliação da influência da variação do pH (3,0, 3,5 e 4,0) e da concentração de material encapsulante (1, 2 e 3%) sobre o rendimento de coacervado seco através do uso de álcoois. O melhor resultado destes ensaios foi tomado como ponto de partida para definir o método de microencapsulação.

Observa-se, na tabela 3, que o melhor rendimento de coacervado foi obtido com pH 3,5 e com 2% de material encapsulante. Esses testes foram realizados sem o nitro composto não havendo, portanto, centrifugação do sistema.

TABELA 3 – Rendimento de coacervado* de acordo com a porcentagem de gelatina e goma arábica em presença de três valores de pH

Ensaios	Porcentagem de material encapsulante (p/v)	pH	Rendimento
1	1	3,0	44
2	1	3,5	54
3	1	4,0	48
4	2	3,0	70
5	2	3,5	87
6	2	4,0	73
7	3	3,0	67
8	3	3,5	74
9	3	4,0	69

* secagem por álcool.

Observou-se que os ensaios realizados em pH 3,5 resultaram sempre em maior rendimento comparado aos ensaios realizados em pH 3,0 e 4,0. Pode-se atribuir este fato à questão da maior proximidade do pH do sistema ao ponto de equivalência elétrica, pI, quando os dois polímeros empregados possuem cargas opostas e equivalentes, possibilitando maior e mais intensa interação entre os polímeros. Assim, uma quantidade reduzida de complexo com cargas residuais

que possibilitam a sua solubilização é formada. Este fato corrobora o resultado de trabalhos similares disponíveis na literatura (ICHWAN *et al*, 1999; TAKENAKA *et al*, 1980; RABISKOVA & VALASKOVA, 1998; BURGESS & PONSART, 1998; BURGESS, 1990).

5.2 – Padronização da técnica de microencapsulação e secagem das microcápsulas

Vários ensaios foram realizados para que se definisse o método descrito no item 4.2.2. A partir de dados da literatura e dos resultados dos ensaios preliminares adaptou-se a técnica etapa por etapa. Constatou-se, experimentalmente, que algumas condições de trabalho são essenciais para o sucesso do método e nem sempre encontram-se devidamente esclarecidas nos trabalhos científicos consultados. Isso se refere principalmente às etapas de secagem por álcoois e separação dos compostos livres e microencapsulados por centrifugação. Ressalta-se que os equipamentos e vidrarias utilizados para a obtenção das microcápsulas não são suficientemente descritos na literatura.

O formaldeído pode ser usado para inibir a solubilização do complexo gelatina-goma arábica através da sua reação com os grupos $-NH_2$ da gelatina ($RNH_2 + O=CH_2 \rightarrow RN=CH_2$). Adicionalmente aos testes descritos no item 4.2.1 ensaios foram realizados empregando-se 7,5 mL de formaldeído com uma hora de agitação após a etapa do resfriamento em banho de gelo, obtendo-se rendimentos de 87, 92 e 84% de coacervado seco, para as quantidades de material encapsulante iguais a 1, 2 e 3%, respectivamente, trabalhando-se em pH 3,5. Para o melhor rendimento obtido, 87%, (tabela 3) observou-se aumento de apenas 5%. Considerando este pequeno acréscimo e o fato do formaldeído provavelmente interferir nos resultados dos ensaios microbiológicos optou-se por não incluir este reagente químico no método.

Na etapa de secagem das microcápsulas por álcoois ocorreu aglomeração do coacervado gerando material compacto de consistência elástica inutilizando totalmente o produto obtido. Várias tentativas foram realizadas, utilizando

somente etanol absoluto ou diluído (10, 20, 30%), como também isopropanol P.A. em várias concentrações. Observou-se a formação de aglomerados durante ou após a adição dos álcoois, bem como durante a secagem final em presença de pentóxido de fósforo. Testou-se o uso combinado dos álcoois etílico e isopropílico observando-se que a ordem de adição dos mesmos também influencia na secagem das microcápsulas. Obteve-se melhores resultados com a adição inicial de isopropanol. Constatou-se que adição dos álcoois puros deve ser lenta, mas notou-se que o sucesso da operação somente foi conseguido se inicialmente fosse adicionado isopropanol diluído seguido pelo etanol absoluto. Este procedimento evitou a agregação do material.

Ressalta-se que o volume de álcool adicionado também influencia a obtenção de microcápsulas em pó. Para volumes menores que 200 mL de etanol absoluto a aglomeração se deu no período de secagem em presença de pentóxido de fósforo. Para volumes acima de 200 mL não foi constatado este problema.

FIGURA 15: Aglomerado de coacervado seco.

Na etapa de centrifugação do sistema (item 4.2.2) para a separação do nitro composto livre e microencapsulado ocorreu novamente a aglomeração do coacervado provocado pela força centrífuga gerada, de forma a inutilizar o material ou promover a redução do rendimento do coacervado seco. Vários ensaios foram realizados variando a velocidade e o tempo de centrifugação. Apresenta-se na tabela 4 os melhores resultados obtidos nestes experimentos. Ressalta-se que a porcentagem de microencapsulação é um valor estimado, pois depende da massa de coacervado obtida que é influenciada pela centrifugação.

TABELA 4 – Influência da centrifugação sobre o rendimento de coacervado* e % de microencapsulação

Ensaio	Velocidade de Centrifugação (rpm/minuto)	Rendimento de Coacervado (%)	% microencapsulação
A	2000/ 5'	0	0
B	1000/ 5'	0	0
C	500/ 5'	43	10
D	500/ 2,5'	50	29
E	500/ 1'	73	52

- secagem por álcoois

Notou-se que o emprego de filtração sob pressão reduzida é totalmente inapropriado, pois também promove a aglomeração do material. Sendo assim, utilizou-se a filtração em funil de Büchner com diâmetro de 15 cm em papel.

O emprego de rota-evaporação para a secagem também não se mostrou adequada, mesmo realizando vários testes variando-se a intensidade da pressão do sistema e temperatura do banho de água sempre ocorreu a dissolução do complexo gelatina-goma arábica inutilizando o material.

A secagem por atomização apresentou importantes características como rapidez e ausência de aglomeração do coacervado. Devido às dimensões do aparelho foi necessário o aumento na quantidade de produto a ser seco, optando-se em aumentar em 10 vezes as quantidades de água, goma arábica, gelatina e nitro composto mantendo-se as proporções iniciais (100:1:1:0,05). Desta forma verificou-se que o aumento de escala do processo é viável.

5.3 – Identificação das microcápsulas por microscopia óptica

A confirmação da formação das microcápsulas com ausência e presença dos nitro compostos foi obtida por técnica de microscopia óptica. As figuras de 16 a 18 apresentam fotos obtidas de amostras ainda hidratadas, coletadas após a centrifugação do sistema. A variação de cor entre as figuras está relacionada ao uso de diferentes filtros que possibilitam uma melhor visualização das amostras.

A figura 16 apresenta fotos de ensaios iniciais realizados antes da padronização do método descrito no item 5.1. Visualiza-se o coacervado de forma amorfa devido ao pouco ajuste das variáveis do processo. As figuras 17 e 18 são fotos dos experimentos do item 5.1 para os valores de pH 3,5 e 3,0 respectivamente. Observa-se que o pH do sistema altera a formação das microcápsulas, como era esperado. Na figura 17 visualiza-se a presença de material amorfo entre as microcápsulas de contornos redondos a elipsóides e nas amostras da figura 18 praticamente não há este material.

FIGURA 16: Microscopia óptica do coacervado amorfo (400X).

FIGURA 17: Microscopia óptica de coacervado. Presença de material amorfo entre as microcápsulas (400x).

FIGURA 18: Microscopia óptica de microcápsulas, recém preparadas (400x).

Na figura 19 observa-se fotos dos nitro derivados dispersos na solução de gelatina e goma arábica antes da correção do pH do sistema.

Nas figuras 20, 21 e 22 observa-se foto de microcápsulas sem nitro composto hidratadas, onde observa-se distribuição heterogênea do diâmetro das microcápsulas, secas por álcoois e secas por atomização respectivamente. Nota-se grande semelhança na morfologia do produto seco por álcoois e hidratado, permitindo concluir que este método praticamente não interfere na integridade das microcápsulas, a não ser pelo fato dos diâmetros das partículas secas serem menores em relação ao produto úmido. Já o produto seco por atomização apresentou morfologia diferente em relação ao produto hidratado com distribuição heterogênea dos diâmetros. Esta alteração é atribuída a ação do atomizador.

Nas figuras 23 a 26 observa-se microcápsulas recém preparadas com os quatro nitro compostos utilizados neste trabalho. Observa-se grande semelhança dos produtos em todos os ensaios, inclusive em relação à figura 20, microcapsulas sem nitro composto, demonstrando a não interferência dos nitro compostos na formação das microcápsulas.

As figuras de 27 a 30 são fotos de microcápsulas contendo os nitro compostos secas por álcoois. Todos os produtos apresentam grande semelhança entre si. Como discutido anteriormente esta técnica de secagem não interferiu na morfologia das microcápsulas.

As figuras de 32 a 35 são fotos de microcápsulas contendo os nitro compostos secas por atomização. Todos os produtos apresentaram semelhança entre si, porém, sua morfologia difere dos produtos ainda hidratados (figuras 23 a 26).

FIGURA 19: Nitro derivados dispersos em solução de gelatina e goma arábica (100x). A,B: 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida; C,D: 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida; E,F: 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida; G,H: 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida.

800X

400X

800X

100X

400X

100X

FIGURA 20: Microcápsulas sem nitro composto.

FIGURA 21: Microcápsulas secas por álcoois sem nitro composto (400x).

FIGURA 22: Microcápsulas secas por atomização sem nitro composto (400x).

FIGURA 23: Microcápsulas contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida recém preparadas (100x).

100X

800X

800X

800X

1000X

FIGURA 24: Microcápsulas contendo 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida recém preparadas.

FIGURA 25: Microcápsulas contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida recém preparadas (100x).

FIGURA 26: Microcápsulas contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida recém preparadas (100x)..

FIGURA 27: Microcápsulas secas por álcoois contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida (400x)..

FIGURA 28: Microcápsulas secas por álcoois contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida (400x)..

FIGURA 29: Microcápsulas secas por álcoois contendo 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida (400x).

FIGURA 30: Microcápsulas secas por álcoois contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida (400x)..

FIGURA 31: Microcápsulas secas por atomização contendo 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida (400x).

FIGURA 32: Microcápsulas secas por atomização contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida (400x).

FIGURA 33: Microcápsulas secas por atomização contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida (400x).

FIGURA 34: Microcápsulas secas por atomização contendo 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida.

5.4 – Avaliação da interferência do material de encapsulação

A utilização de microcápsulas sem nitro composto na técnica de dosagem do conteúdo do princípio ativo, propiciou a verificação do grau de interferência do material encapsulante. Ressalta-se a não ocorrência de qualquer absorção deste material na faixa de absorção dos nitro compostos estudados na região do UV.

5.5 – Obtenção de curvas de absorção no UV-VIS

Observou-se que o $\lambda_{\text{máx}}$ dos compostos analisados situam-se em faixa estreita do espectro UV-VIS. As figuras 35 a 38 indicam o $\lambda_{\text{máx}}$ de cada composto analisado, em DMSO.

FIGURA 35: Curva de absorção no UV-VIS da 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida, em DMSO.

FIGURA 36: Curva de absorção no UV-VIS da 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida, em DMSO.

FIGURA 37: Curva de absorção no UV-VIS da 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida, em DMSO.

λ	Absorbância
377	0,4374
378	0,4407
379	0,4404
380	0,4384
381	0,4418
382	0,4402
383	0,4410
384	0,4378
385	0,4356

FIGURA 38: Curva de absorção no UV-VIS da 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida, em DMSO.

5.6 – Curvas de calibração

Apresenta-se nas figuras 39 a 42 as curvas de calibração dos compostos analisados. M é a concentração do composto em $\text{mol/L} \times 10^{-6}$ e Abs é o valor de absorbância da amostra.

FIGURA 39: Curva de calibração da 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida, em DMSO.

FIGURA 40: Curva de calibração da 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida, em DMSO.

FIGURA 41: Curva de calibração da 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida, em DMSO.

FIGURA 42: Curva de calibração da 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida, em DMSO.

Apresenta-se, a seguir, os resultados da determinação da concentração do derivado nitro-heterocíclico microencapsulado nos ensaios C e D (tabela 4) de acordo com a técnica descrita no item 4.2.2. A amostra obtida no ensaio E foi utilizada nos ensaios biológicos e a determinação da sua concentração encontra-se no item 5.7.

Tabela 5 – Absorbâncias das amostras do ensaio C

Concentração de microcápsulas	Amostra			Relação massa	
	1	2	3	Média	microcápsula: massa nitro-composto (µg)
1mg/mL	0,1589	0,1447	0,1598	0,1598	5000:10,9
2mg/mL	0,3077	0,3095	0,3057	0,3076	10000:21,8

TABELA 6 – Absorbâncias das amostras do ensaio D

Concentração de microcápsulas	Amostra			Relação massa	
	1	2	3	Média	microcápsulas: massa nitro composto (µg)
1mg/mL	0,4690	0,4481	0,4705	0,4625	5000:32,8
2mg/mL	1,0180	1,0350	0,9003	0,9844	10000:70,0

5.7 – Dosagem dos nitro compostos microencapsulados e porcentagem de microencapsulação

A partir da técnica descrita no item 4.2.8 foi possível estabelecer a relação massa microcápsulas: massa nitro composto e a porcentagem de microencapsulação das oito amostras obtidas, a saber: quatro obtidas pela técnica de secagem por álcoois e quatro obtidas pela técnica de atomização. Esses dados estão apresentados nas tabelas de 7 a 10 e 11 a 14, respectivamente.

TABELA 7 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida em microcápsulas*.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,6751	0,6355	0,6377	1,2092	1,2211	1,2110
	0,6772	0,6335	0,6389	1,2066	1,2230	1,2120
	0,6765	0,6349	0,6399	1,2016	1,2239	1,2110
Médias	0,6763	0,6346	0,6388	1,2058	1,2227	1,2113
Média das médias	0,6499			1,2133		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:46,5			5000:86,6		
% microencapsulação	56			52		
Rendimento de microcápsulas (%)	73					

*Processo de secagem por álcoois.

TABELA 8 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida em microcápsulas*.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,7500	0,7317	0,7450	1,5095	1,5140	1,5178
	0,7498	0,7320	0,7433	1,5086	1,5137	1,5189
	0,7496	0,7314	0,7425	1,5083	1,5128	1,5173
Médias	0,7498	0,7317	0,7436	1,5088	1,5135	1,5178
Média das médias	0,7417			1,5134		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:56,5			5000:117,2		
% microencapsulação	72			75		
Rendimento de microcápsulas (%)	78					

*Processo de secagem por álcoois.

TABELA 9 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida em microcápsulas*.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,5804	0,5585	0,5480	1,1672	1,1515	1,1499
	0,5824	0,5593	0,5516	1,1682	1,1505	1,1515
	0,5800	0,5593	0,5516	1,1682	1,1533	1,1520
Médias	0,5809	0,5590	0,5504	1,1679	1,1518	1,1511
Média das médias	0,5634			1,1569		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:44,8			5000:90,6		
% microencapsulação	59			60		
Rendimento de microcápsulas (%)	81					

*Processo de secagem por álcoois.

TABELA 10 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida em microcápsulas*.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,6497	0,6873	0,6880	1,4180	1,4140	1,4178
	0,6508	0,6899	0,6884	1,4144	1,4145	1,4178
	0,6565	0,6873	0,6892	1,4178	1,4142	1,4143
Médias	0,6523	0,6882	0,6885	1,4167	1,4142	1,4166
Média das médias	0,6763			1,4158		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:59,8			5000:125,53		
% microencapsulação	72			75		
Rendimento de microcápsulas (%)	73					

*Processo de secagem por álcoois.

TABELA 11 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida em microcápsulas*.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,3859	0,3718	0,3866	0,7370	0,7861	0,7711
	0,3856	0,3708	0,3876	0,7355	0,7861	0,7723
	0,3849	0,3722	0,3859	0,7355	0,7861	0,7709
Médias	0,3855	0,3719	0,3867	0,7360	0,7861	0,7714
Média das médias	0,3814			0,7645		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:27,4			5000:54,6		
% microencapsulação	30			30		
Rendimento de microcápsulas (%)	66					

*Processo de secagem por atomização.

TABELA 12 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida em microcápsulas.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,3445	0,3617	0,3499	0,7295	0,7045	0,7090
	0,3497	0,3617	0,3497	0,7295	0,7045	0,7065
	0,3472	0,3617	0,3497	0,7309	0,7045	0,7088
Médias	0,3471	0,3617	0,3498	0,7300	0,7045	0,7081
Média das médias	0,3529			0,7142		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:26,0			5000:54,4		
% microencapsulação	27			28		
Rendimento de microcápsulas (%)	63					

*Processo de secagem por atomização.

TABELA 13 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida em microcápsulas*.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,2521	0,2594	0,2686	0,5416	0,5313	0,5412
	0,2534	0,2594	0,2688	0,5416	0,5326	0,5412
	0,2532	0,2594	0,2686	0,5429	0,5309	0,5412
Médias	0,2529	0,2594	0,2687	0,5420	0,5316	0,5412
Média das médias	0,2603			0,5383		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:21,4			5000:42,8		
% microencapsulação	19			19		
Rendimento de microcápsulas (%)	54					

*Processo de secagem por atomização.

TABELA 14 – Doseamento de 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida em microcápsulas*.

Concentração de microcápsula	0,5 mg/mL			1,0 mg/mL		
Absorbância	0,2427	0,2479	0,2349	0,4895	0,4621	0,5126
	0,2415	0,2481	0,2368	0,4899	0,4618	0,5138
	0,2423	0,2492	0,2372	0,4899	0,4610	0,5150
Médias	0,2422	0,2484	0,2363	0,4898	0,4616	0,5138
Média das médias	0,2423			0,4884		
Relação massa microcápsulas: massa nitro composto (µg)	2500:21,1			5000:43,0		
% microencapsulação	21			21		
Rendimento de microcápsulas (%)	61					

*Processo de secagem por atomização.

5.8 – Ensaios biológicos *in vitro*

Ensaaiou-se os compostos puros e microencapsulados, bem como, microcápsulas sem nitro compostos obtidas pelos métodos de secagem por álcoois e por atomização. Avaliou-se o efeito do solvente (DMSO 5 %) sobre o desenvolvimento parasitário e o benznidazol como referência da atividade antichagásica.

Observa-se na tabela 15 que os análogos com maior caráter hidrofóbico, *5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida* e *5-nitro-2-furfurilideno 4-clorobenzidrazida*, apresentaram-se mais ativos que o composto não substituído, *5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida* e o *para* nitro substituído, *5-nitro-2-furfurilideno 4-nitrobenzidrazida*, demonstrando que há tendência, ao favorecimento da atividade biológica, com o aumento da hidrofobicidade da molécula. Esta relação entre a estrutura química e a atividade biológica sustenta a hipótese de que o efeito farmacológico desta série de compostos é influenciado pela hidrofobicidade de grupos substituintes introduzidos no anel benzênico de *5-nitro-2-furfurilideno 4-benzidrazidas* substituídas. Isto ocorre provavelmente pelo aumento da capacidade da molécula em atravessar as barreiras biológicas e alcançar o sítio de ação e, assim, produzir o efeito farmacológico. Toma-se necessário, no entanto, a ampliação no número de compostos da série para estabelecer maior confiabilidade a esta hipótese.

TABELA 15 – Número médio (10^6) de formas epimastigotas após tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de nitro derivados.

Dias	Controle (+)	R-			
		H	NO ₂	Br	Cl
0	21,0	21,6	20,6	21,6	20,0
1	31,0	12,0	6,6	5,7	6,0
2	49,3	1,7	1,3	-	-
3	61,0	-	-	-	-
4	63,0	-	-	-	-

Realizou-se ensaios com microcápsulas sem nitro composto, obtidas pelas técnicas de secagem por álcoois e atomização, nas concentrações de 6 e 12 mg/mL respectivamente e não observou-se diferença do crescimento populacional dos parasitas em relação ao controle positivo (tabela 16), evidenciando a não interferência do material encapsulante sobre o desenvolvimento da cultura, possibilitando atribuir a atividade tripanomicida apresentada na tabela 15 somente aos nitro compostos. As duas concentrações empregadas são superiores às massas de microcápsulas contendo 100 μg dos compostos.

TABELA 16 – Número médio (10^6) de formas epimastigotas após tratamento com microcápsulas sem nitro composto e DMSO 5%

DIAS	Controle (+)	Microcápsulas secas por álcoois (6 mg/mL)	Microcápsulas secas por atomização (12 mg/mL)	DMSO 5%
0	20,7	20,7	21,0	21,0
1	33,0	29,0	31,7	31,0
2	50,0	48,0	52,0	49,0
3	60,3	62,7	63,0	62,0
4	61,7	64,0	64,0	63,0

*. 10^6

Observa-se na tabela 17 o desenvolvimento parasitário frente a duas concentrações do fármaco benznidazol, utilizado na terapêutica da Doença de Chagas e empregado como padrão da bioatividade neste trabalho. Comparando-se os resultados desta tabela com os resultados da tabela 15 nota-se que os nitro compostos são muito mais ativos do que o fármaco padrão, pois, mesmo empregando-se 100 $\mu\text{g/mL}$ de benznidazol, observa-se no 12º dia do experimento que ainda haviam formas parasitárias ativas. Em contra partida observa-se que no máximo no 3º dia os nitro compostos já eliminaram todas formas evolutivas.

TABELA 17 – Número médio* de formas epimastigotas após tratamento com benznidazol em duas concentrações

Dias	Controle (+)	Benznidazol	
		50 µg/mL	100 µg/mL
0	20,3	20,0	20,5
1	33,0	22,5	25,0
2	49,7	23,0	17,5
3	62,7	15,5	17,0
4	58,7	17,5	13,0
5	65,0	18,0	14,0
8	69,0	21,0	12,5
10	95,0	17,5	11,0
12	115,0	14,5	5,5

* .10⁶

Nas tabelas 18 e 19 apresentam-se os resultados dos ensaios biológicos realizados com os compostos microencapsulados e secos pelos métodos utilizando álcoois e atomização respectivamente. Observa-se que todos os produtos se mostraram ativos frente ao parasita. Estes resultados foram utilizados para a confecção das tabelas 20 e 21.

Nas tabelas 20 e 21 apresentam-se os valores em porcentagem da redução populacional das formas epimastigotas após tratamento com nitro derivados microencapsulados secos pelos métodos utilizando álcoois e atomização respectivamente.

Observa-se na tabela 20 que a redução populacional ocorreu de maneira mais lenta quando compara-se com a tabela 21, pois, por exemplo, no segundo

dia do experimento na tabela 20 a porcentagem de redução populacional é de 9,5, 16, 30 e 26% para os análogos não substituído, nitro substituído, bromo substituído e cloro substituído respectivamente, enquanto que, na tabela 21, nestas mesmas condições a redução populacional é de 65, 74, 86 e 83%. Este comportamento demonstra que a secagem por álcoois por preservar a morfologia inicial das microcápsulas (figuras 27 a 30) possibilita o prolongamento do processo de liberação dos nitro compostos e que a secagem por atomização, por modificar a morfologia inicial das microcápsulas, não possibilita este mesmo comportamento.

Embora a atomização ter se mostrado como uma técnica rápida que não provoca aglomeração do coacervado, os produtos secos por esta técnica não conseguiram preservar a morfologia das microcápsulas, figuras 31 a 34, resultando, conseqüentemente, em perda do benefício do processo de microencapsulação.

TABELA 18 – Número médio (10^6) de formas epimastigotas após tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de nitro derivados microencapsulados. Produto seco por álcoois

DIAS	Controle (+)	-R			
		H	NO ₂	Br	Cl
0	20,7	21,0	20,3	21,6	22,0
1	31,7	19,0	17,0	15,0	16,3
2	48,7	15,3	12,0	7,3	5,3
3	61,0	9,0	6,0	1,6	2,0
4	60,0	2,7	3,0	0,3	1,0
5	71,7	0,7	0,3	-	-
6	81,7	-	-	-	-

TABELA 19 – Número médio* de formas epimastigotas após tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de nitro derivados microencapsulados. Produto seco por atomizador.

DIAS	Controle (+)	R-			
		H	NO ₂	Br	Cl
0	20,7	21,0	20,3	21,6	22,0
1	23,0	10,0	8,7	6,3	6,3
2	56,7	7,3	5,3	3,0	3,7
3	63,3	2,0	1,0	0,3	0,7
4	60,0	-	-	-	-
5	67,0	-	-	-	-
6	66,3	-	-	-	-

*.10⁶

TABELA 20 – Redução populacional das formas epimastigotas, em porcentagem, após tratamento com 50 µg/mL de nitro derivados microencapsulados. Produto seco por álcoois

DIAS	-R			
	H	NO ₂	Br	Cl
0	0	0	0	0
1	9,5	16	30	26
2	27	41	66	76
3	57	70	93	91
4	87	85	99	95
5	97	98	100	100
6	100	100	100	100

TABELA 21 – Redução populacional das formas epimastigotas, em porcentagem, após tratamento com 50 µg/mL de nitro derivados microencapsulados. Produto seco por atomizador

DIAS	-R			
	H	NO ₂	Br	Cl
0	0	0	0	0
1	52	57	72	72
2	65	74	86	83
3	90	95	97	97
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	100	100	100	100

6 – *Conclusões*

- Os compostos nitro-heterocíclicos empregados nos ensaios biológicos se mostraram ativos frente à cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.
- O método de microencapsulação e secagem das microcápsulas foram padronizados possibilitando obter-se microcápsulas com reprodutibilidade compatível com a ampliação de escala.
- O método de microencapsulação e a secagem por álcoois utilizados resultaram em liberação lenta dos nitro compostos sinalizando a possibilidade de utilização deste sistema vetor em estudos mais aprofundados com vistas a melhorar a eficácia antichagásica desses compostos.

7 – Anexos

FIGURA 43: Aspecto macroscópico de microcápsulas contendo o nitro composto (A), microcápsulas sem o composto (B) e do nitro composto puro(C).

FIGURA 44: Mistura gelatina-goma arábica antes (à direita) e após correção do pH (à esquerda). A = Fase pobre em colóides; B = Fase rica em colóides.

8 – Referências Bibliográficas

- AKIYAMA, Y., YOSHIOKA M., HORIBE H., INADA Y., HIRAI S., KITAMORI N., TOGUCHI H. Anti-hypertensive effect of oral controlled-release microspheres containing an ACE inhibitor in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.46, p.661-665, 1994.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.G.; JR, L.V.A. **Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000. p. 238-245.
- ANTONOV, Y.A.; GLOTOVA, Y.K.; MALOVIKOVA, A.; MARKOVICH, O. Effect of the structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.10, n.1, p.1-9, 1996.
- AMIET-CHARPENTIER, C.; BENOIT, J.P.; GADILLE, P.; RICHARD, J. Preparation of rhizobacteria-containing polymer microparticles using a complex coacervation method. **Colloids Surf., A**, Amsterdam, v.144, p.179-190, 1998.
- BIDAH, D., VERGNAUD, J.M. Dosage forms with a polymer matrix and a swelling polymer. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 45, p. 394-399, 1993.
- BURGESS, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v.140, n.1, p.227-238, 1990.
- BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.27, p.61-70, 1985.
- BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Complex coacervate formation between acid- and alkaline-processed gelatins. In: EISENBERG, A.; BAILEY, F.E., eds. **Coulombic Interactions in macromolecular systems**. Washington: American Chemical Society, 1986. cap.21, p.251-260. (ACS Symposium Series, 302).

- BURGESS, D.J.; PONSART, S. β -Glucuronidase activity following complex coacervation and spray-drying microencapsulation. **J. Microencapsulation**, Basingstoke, v.15, n.15, p.569-579, 1998.
- BURGESS, D.J.; KWOK, K.K.; MEGREMIS, P.T. Characterization of albumin-acacia complex coacervation. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.43, p.232-236, 1991.
- BRAUDO, E.E.; ANTONOV, Y.A. Non-coulombic complex formation of proteins as a structure forming factor in food systems. In: SCHWENKE, K.D.; MOTHES, R., eds. **Food proteins, structure and functionality**. Weinheim: VCH, 1993. p.210-215. (Symposium on Food Proteins "Structure: Functionality Relationships", 4, Reinhardsbrunn, 1992).
- BUNGENBERG DE JONG, H.G. Crystallisation, coacervation, flocculation. In: KRUYT, H.R.; ed. **Colloid science**. New York: Elsevier, 1949. v.2, cap.8, p.232-258.
- CERECETTO, H.; DiMAIO, R.; IBARRURI, G. Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nítro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. **Farmaco**, Paris, v.53, p.89-94, 1997.
- CHISTÉ, J.J. **Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida**. São Paulo, 1998. 86p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- DANIELS, R.; MITTERMAIER, E.M. Influence of pH adjustment on microcapsules obtained from complex coacervation of gelatin and acacia, **J. Microencapsulation**, Basingstoke, v.12, n.6, p.591-599, 1995.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.17, p.25-39, 2003.

- DICKINSON, E. Protein-polysaccharide interaction in food colloids. In: DICKINSON, E.; WALSTRA, P.; eds. **Food colloids and polymers: stability and mechanical properties**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p.77-93. (Royal Society of Chemistry. Special publication, n.113) (Proceedings of a conference, Lunteren,
- DODD, M.C.; STILLMAN, W.B. The *in vivo* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v.82, n.1, p.11-18, 1944.
- DONG, C.; ROGERS, J.A. Acacia-gelatin microencapsulated liposomes: preparation, stability, and release of acetylsalicylic acid. **Pharm. Res.**, Dordrecht, v.10, p.141-146, 1993.
- FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A., eds. **Principles of medicinal chemistry**. 4.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p.111, 742, 769.
- FURLANETTO, M.; TAVARES, L.C. Determinação experimental e validação de descritor estrutural de caráter eletrônico em 4-benzidrazidas substituídas potencialmente antichagásicas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 10, São Paulo, 2002. **Resumos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. v.2, p.160, res.16.20.
- FURLANETTO, M.; SANTOS, M.G.B.; TAVARES, L.C. Avaliação da influência de grupos substituintes sobre a atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.37, supl.1, p.62, 2001.
- GELB, M.H.; HOL, W.G.J. Drugs to combat tropical protozoan parasites. **Science**, Washington, v.297, p.343-344, 2002.
- GONZÁLES-MARTIN, G.; MERINO, I.; OSUA, A. Characterization and trypacidal activity of nifurtimox-containing and empty nanoparticles of

polyethylcyanoacrylates. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.50, p.29-35, 1998.

HILL, S.E.; MITCHELL, J.R. Chemical interactions in mixed biopolymer systems. In: HARDING, S.E.; HILL, S.E.; MITCHELL, J.R., eds. **Biopolymer mixtures**. Nottingham: Nottingham University Press, 1995. p.437-458.

ICHWAN, A.M.; KARIMI, M.; ALEKHA, K.D. Use of gelatin-acacia coacervate containing benzocaine in topical formulations. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.88, n.8, p.763-766, 1999.

JAVIDAN, S.; MRTEK, R.G. Microbiological determination of drug partitioning III: partition coefficient profiles of several antimicrobial agents. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.62, n.3, p.424-435, 1973.

KHALIL, S.A.H.; NIXON, J.R.; CARLESS, J.E. Role of pH in the coacervation of the systems: gelatin-water-ethanol and gelatin-water-sodium sulfate, **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.20, p.215-255, 1968.

KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2.ed. New York: Wiley Interscience, 1988. p.158-159, 666-675, 745-746, 749.

LIM, F. **Biomedical applications of microencapsulation**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.1-51.

MASUNARI, A.; NASCIMENTO, F.L.L.; FURLANETTO, M.; SANTOS, M.G.B.S.; PENNA, T.C.V.; MAMIZUKA, E.M.; TAVARES, L.C. Determinação da atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente às cepas padrão e multi-resistente de *staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.39, supl.3, p.192-194, 2003.

MASUNARI, A.; TAVARES, L.C. Antimicrobial activity optimization of 5-nitro-2-thiophyllidene derivatives against multi-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Drugs Future**, Barcelona, v.27, suppl.A, p.183, 2002. (Abstracts from

the XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry, september 1-5, 2002 - Barcelona, Spain).

MASTERS, K. **Spray Drying**, London, Leonard Hill Books, 1972.

MOLINA, J.; URBINA, J.; GREF, R.; BRENER, Z.; RODRIGUES, J.M. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole DO870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.47(1), p.101-104, 2001.

NAKAJIMA, A.; SATO, H. Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. **Biopolymers**, Hoboken, v.10, p.1345-1355, 1972.

NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E.J.; LEHMANN, T.; SANCHEZ-DELGADO, R.A.; ATENCIO, R.; SILVA, P.; LIRA, R.; URBINA, J.A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 6. Synthesis and characterization of new copper(II) and gold(I) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. **Inorg. Chem.**, Columbus, v.40, n.27, p.6879-6884, 2001.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.73-96.

OLIVEIRA, G.A.; DELL'AQUILA, A.M.; MASIERO, R.L.; LEVY, C.E.; GOMES, M.S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v.22, n.7, p.443-448, 2001.

OVERBEEK, J.T.J.; VOORN, M.J. Phase separation in polyelectrolyte solutions: theory of complex coacervation. **J. Cell. Comp. Physiol.**, Philadelphia, v.49, suppl.1, p.7, 1957.

PAULINO, M.; IRIBANE, F.; HANSZ, M.; VEJA, M.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; OLEA, C.;

- STOPPANI, A.O.M.; BERRIMAN, M.; FAIRLAMB, A.H.; TAPIA, O. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compound. **J. Mol. Struct.**, Amsterdam, v.584, p.95-105, 2002.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.O.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galénica**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992. v.1, p.931-934, 947-948, 965-968.
- RABISKOVA, M.; VALASKOVA, J. The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation. **J. Microencapsulation**, Basingstoke, v.15, n.6, p.747-751, 1998.
- RANDO, D.G.; SATO, D.N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C.Q.F.; AMARAL, A.T.; FERREIRA, E.I.; TAVARES, L.C. Potential tuberculostatic agents: topliss application on benzoic acid-[(5-nitrothiophen-2-yl-)methylene]-hydrazide series. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.10, n.3, p.557-560, 2002.
- RE, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technol.**, Monticello, v.16, n.6, p.1195-1236, 1998.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.151-199.
- REMUNÁN-LOPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formulation of chitosan-gelatin coacervates. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.135, p.63-72, 1996.
- REZENDE, P. **Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente a cepas de Staphylococcus aureus**. São Paulo, 2002. 182p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- REZENDE, P.; MASUNARI, A.; SANTOS, M.G.B.; PENNA, T.C.V.; MAMIZUKA, E.M.; TAVARES, L.C. Hansch analysis of nifuroxazide analogs with antimicrobial activity against MRSA. **Drugs Future**, Barcelona, v.27, suppl.A, p.184, 2002. (Abstracts from the XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry, september 1-5, 2002 - Barcelona, Spain).
- ROBINSON, D.S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: ACRIBIA, 1991. 516p.
- SANCHEZ, C.; RENARD, D. Stability and structure of protein-polysaccharide coacervates in the presence of protein aggregates. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.242, p.319-324, 2002.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredinets. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.33, n.6, p.501-547, 1993.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENSZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, São Paulo, v.20, p.191-207, 1953.
- SINGH, O.N.; BURGESS, D.J. Characterization of albumin-alginic acid complex coacervation. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.41, p.670-673, 1989.
- STAINSBY, G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. **Food Chem.**, Amsterdam, v.6, p.3-14, 1980.
- STEPHEN, A.M., ed. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.377-440. (Food Sciences and Technology, 67).
- TABATA, Y.; IKADA, Y. Protein release from gelatin matrices. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.31, p.287-301, 1998.
- TAINAKA, K.I. Effect of counterions on complex coacervation. **Biopolymers**, Hoboken, v.19, p.1289-1298, 1980.

- TAINAKA, K.I. Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. 1. Salt free systems. **J. Phys. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.46, n.6, p.1899-1906, 1979.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S.Y. Micromeritic properties of sulfamethoxazole microcapsules prepared by gelatin-acacia coacervation. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.69, n.5, p.513-516, 1980.
- TAVARES, L.C. **Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida**. São Paulo, 1993. 186p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- TAVARES, L.C.; FERREIRA, E.I. Relações quantitativas estrutura-atividade: fundamentos e aplicações da análise de Hansch. In: PRADO, M.A.F.; BARREIRO, E.J. **Prácticas de química farmacêutica y medicinal**. Pamplona: SYTED-Red Iberoamericana para la Investigación, Diseña, y Desarrollo de Medicamentos, 2002. p.36-66.
- TAVARES, L.C.; PENNA, T.C.V.; AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, v.136, n.3, p.244-249, 1997.
- TEDLAOUTI, F.; GASQUET, M.; DELMAS, F. Synthesis and study of antiprotozoal activity of some 5-nitrothiophene aldimines. **Farmaco**, Paris, v.46, n.10, p.1195-1201, 1991.
- TDR. The Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. **Drug Discovery Research**. 2001. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/grants/workplans/pdf/drug.pdf>. Acesso em: 10 jan 2003.
- TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A., eds. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.171-198.

- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p.618, 409-412, 562-563.
- USP DI. 12.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1992. p.1, 154. [Drug information for the health care professional, v.3].
- VEIS, A.; ARANYI, C. Phase separation in polyelectrolyte systems. 1. Complex coacervation of gelatin. **J. Phys. Chem.**, Easton, v.64, p.1203-1210, 1960.
- VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CHAVIÉRE, G.; BALAKARA, N.; PÉRIE, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.57, n.5, p.549-557, 1999.
- WADE, A.; WELLER, P.J., eds. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 2.ed. Washington: American Pharmaceutical Association; London: Pharmaceutical Society of Great Britain, 1994. p.1-2, 199-201.
- WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A., eds. **Chagas' disease (american trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT Brazil'92, 1992. p.103-143.
- WHO. **Chagas**. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>. Acesso em: 13 set. 2002.
- ZANOWIAK, P. Pharmaceuticals, Controlled release, In: SPARKS, R.E. **Encyclopedia of technology**. New York: John Wiley & Sons, v.17, p. 290-295, 1982.
- ZUCCOTTO, F.; ZVELEBIL, M.; BRUN, R.; CHOWDHURY, S.F.; LUCREZIA, R.; LEAL, I.; MAES, L.; RUIZ-PEREZ, L.M.; PACANOWSKA, D.G.; GILBERT, I.H. Novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. **Eur. J. Med. Chem.**, Amsterdam, v.36, p.395-405, 2001.

De acordo com a Norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2004 [CD-ROM].