UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de
benznidazol com ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis

Janisse Crestani de Miranda

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo
2008

Janisse Crestani de Miranda

Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de
benznidazol com ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico este trabalho aos meus pais, *Neli e Ramão*, que sempre estiveram ao meu lado incentivando minhas escolhas, acreditando no meu futuro profissional e acima de tudo amando-me muito.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, pela orientação imprescindível para realização deste trabalho, pela oportunidade e apoio durante o mestrado.

À Prof^a Dr^a Letícia Carpentieri, *a Lê*, pela disponibilidade em auxiliar-me, pelos ensinamentos transmitidos e valiosas sugestões na elaboração deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Solange Garcia Pomblum, por ensinar-me a gostar da pesquisa científica e por ter incentivado minha busca pelo aperfeiçoamento profissional.

À minha irmã Elisiane e meu cunhado Reinaldo Júnior, pelo companheirismo e apoio sempre tão sincero e verdadeiro.

Ao meu namorado, Leandro Dutra, pelo carinho, compreensão e por estar sempre ao meu lado.

Às amigas, Eliara Vieira e Michele Garcia, pela amizade, compreensão e paciência nesta fase da minha vida.

Aos queridos amigos e colegas, Michele Georges e Tércio Martins, por me receberem de forma tão afetuosa, pelo auxílio incondicional e por compartilharem as dificuldades e os sucessos durante esse período.

Aos amigos, Paulo Ghedini e Fávero Reisdorfer, pelos conselhos profissionais e por me incentivarem a ficar em São Paulo.

Aos colegas do laboratório de farmacotécnica, Cláudio, Andréa, Patrícia, Silmara, Claudinéia, Carla, Roxana e em especial à Camila Diaz, pela contribuição na realização do trabalho.

Aos colegas do laboratório Bergamo pelo incentivo e apoio.

À Deus, por acompanhar-me em cada passo.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Complexos ternários contendo fármaco, ciclodextrina e polímero hidrossolúvel	1
Resumo	2
1. Introdução	3
2. Formação de complexos ternários	4
3. Eficiência de complexação e constante de estabilidade	7
4. Polímeros utilizados na obtenção de complexos ternários	9
5. Aplicações farmacêuticas dos complexos ternários de inclusão.....	12
Referências	16
 Capítulo 2: Caracterização físico-química e dissolução intrínseca de benznidazol	 21
Resumo	22
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	24
2.1 Materiais	24
2.2 Espectro de absorção no UV.....	24
2.3 Curva analítica	25
2.4 Solubilidade	25
2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	25
2.6 Análise termogravimétrica (TGA)	26
2.7 Recristalização do fármaco	26

2.7.1 Obtenção de cristais	26
2.7.2 Caracterização dos cristais	26
2.8 Dissolução intrínseca	27
3. Resultados e discussão	28
4. Conclusão	37
Referências bibliográficas	37

Capítulo 3: Obtenção e caracterização de complexos binários contendo benznidazol e ciclodextrinas

Resumo	41
1. Introdução	42
2. Material e Métodos	43
2.1 Materiais	43
2.2 Solubilidade de fases	43
2.3 Eficiência de complexação	44
2.4 Preparação das misturas físicas	45
2.5 Preparação dos complexos de inclusão	45
2.5.1 Secagem em estufa	45
2.5.2 Método de co-evaporação	45
2.5.3 Método de liofilização.....	46
2.6 Caracterização dos complexos de inclusão	46
2.6.1 Solubilidade	46
2.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	46
2.6.3 Análise termogravimétrica (TGA)	47
3. Resultados e discussão	47

4. Conclusão	56
Referências bibliográficas	57

Capítulo 4: Obtenção e caracterização de complexos ternários contendo benznidazol, ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis

60

Resumo	61
1. Introdução	62
2. Material e métodos	63
2.1 Materiais	63
2.2 Preparação dos sistemas ternários	64
2.2.1 Secagem em estufa	64
2.2.2 Método de co-evaporação	64
2.2.3 Método de liofilização.....	65
2.3 Caracterização dos complexos ternários	65
2.3.1 Solubilidade dos complexos	65
2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	67
2.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)	67
3. Resultados e discussão	67
5. Conclusão	75
Referências bibliográficas	76

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo obter e caracterizar complexos binários e ternários de benznidazol (BNZ) com ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis com a finalidade de melhorar a solubilidade do fármaco. Efetuou-se a caracterização físico-química do fármaco avaliando-se solubilidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), investigação de novas formas cristalinas e a definição de parâmetros para o ensaio de dissolução intrínseca. Posteriormente, esses dados foram utilizados como referência nos estudos de caracterização dos complexos de inclusão. Os complexos binários utilizaram as ciclodextrinas naturais α CD, β CD e γ CD, e os ternários a β CD e HP β CD e adição de 1,0% de polímeros hidrossolúveis (povidona e copovidona). Os complexos foram secos em estufa e adicionalmente dois métodos de preparo – co-evaporação e liofilização – foram empregados para comparação e escolha do mais adequado. O estudo de caracterização dos complexos foi realizado através do método de solubilidade de fases, DSC e TGA. A constante de estabilidade, a eficiência de complexação e solubilidade sugeriram maior interação do fármaco com a β CD. Nos complexos ternários, a utilização de copovidona foi mais efetiva que a povidona. Houve aumento da solubilidade quando os complexos foram preparados pelo método de liofilização. A melhor solubilidade foi alcançada pelos complexos BNZ: β CD (0,84 mg/mL) e BNZ: β CD:copovidona (0,86 mg/mL) preparados pelo método de liofilização.

Palavras-chave: Benznidazol, Caracterização físico-química, Ciclodextrina, Polímeros hidrossolúveis, Solubilidade.

ABSTRACT

The present study was aimed to obtain and characterize binary and ternary complexes of benznidazole (BNZ) with cyclodextrins and water-soluble polymers with the purpose to improve the solubility of drug. It was performed the physicochemical characterization of BNZ by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TGA), investigation of new crystalline forms and the definition of parameters for the intrinsic drug dissolution test of intrinsic dissolution. Subsequently, these informations were used as reference in the studies of characterization of the inclusion complexes. The binary complexes were prepared with the cyclodextrins α CD, β CD and γ CD and the ternary with β DC and HP β CD and addition of 1.0% of water-soluble polymers (povidone and copovidone). The complexes were dried in tray drayer and additionally two methods of preparation – coevaporation and lyophilization – were employed for comparison and the best was selected. The characterization of the complexes was carried out by phase-solubility method, DSC and TGA. The constant of stability, the efficiency of complexation and solubility suggested higher interaction of the drug with the β CD. In the ternary complexes, the use of copovidone was more effective in the solubility than to povidone. There was an increased of solubility when the complexes were prepared by lyophilization. To best solubility was achieved by the complexes BNZ: β CD (0.84 mg/ml) and BNZ: β CD:copovidone (0.86 mg/ml) prepared by lyophilization method.

Keywords: Benznidazole, physicochemical characterization, Cyclodextrin, water-soluble polymers, Solubility.

Capítulo 1

COMPLEXOS TERNÁRIOS CONTENDO FÁRMACO, CICLODEXTRINA E POLÍMERO HIDROSSOLÚVEL

RESUMO

Fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água têm sido freqüentemente complexados às ciclodextrinas (CDs) para aumentar a solubilidade aquosa e melhorar a dissolução de suas formas farmacêuticas sólidas, visando melhorar a biodisponibilidade dos mesmos. No entanto, as formas farmacêuticas podem atingir um elevado volume, em função da quantidade de CD requerida, sendo necessário aumentar a eficiência de solubilização da CD com menores quantidades das mesmas, o que pode ser obtido com a inclusão de pequenas quantidades de polímeros hidrossolúveis no sistema fármaco:CD. A adição de polímeros hidrofílicos aumenta, marcadamente, a eficiência de complexação das CDs e a constante de estabilidade, indicando maior eficiência de solubilização da CD. A escolha do polímero a ser utilizado na complexação deve ser criteriosa, considerando, principalmente, sua hidrossolubilidade e ausência de atividade farmacológica. Os estudos sobre os complexos ternários ganharam destaque nas últimas décadas, sendo possível encontrar na literatura científica vários fármacos, nos quais a obtenção de complexos fármaco:CD:polímero hidrossolúvel foi objetivo de investigação.

Palavras-chave: Benznidazol, Ciclodextrina, Polímero, Complexos ternários, Solubilidade.

1. Introdução

A complexação com ciclodextrinas (CDs) tem sido freqüentemente usada para aumentar a solubilidade aquosa e dissolução de compostos insolúveis ou levemente solúveis em água, em uma tentativa de melhorar a biodisponibilidade oral (MURA *et al.*, 2001; AMMAR *et al.*, 2006). Quando possível, a concentração de CDs nas formulações deve ser otimizada devido ao volume que as formas farmacêuticas podem atingir e ao seu potencial toxicológico. Assim, a otimização da complexação é muito importante quando a baixa eficiência de complexação requer maior quantidade de CD que o aceitável para formas sólidas ou líquidas (MURA *et al.*, 2001).

O aumento no volume das formulações representa uma etapa crítica na aplicabilidade dos complexos de inclusão com CDs. Pode-se considerar que 1 g de um complexo sólido corresponde de 100 a 250 mg de fármaco (sendo o peso molecular do fármaco de 200 a 400 g/mol e a CD de 1200 a 1500 g/mol). Desse modo, o uso das CDs em formas farmacêuticas sólidas orais é limitada a fármacos em dosagens inferiores a 200 mg e que possuam boas propriedades complexantes (LOFTSSON & BREWSTER, 1996).

Uma estratégia adotada para aumentar a complexação entre o fármaco e a CD é a adição de pequenas quantidades de polímeros hidrossolúveis no sistema, aumentando a eficiência de solubilização da CD com menores quantidades das mesmas (LOFTSSON & FRIDRIKSDÓTTIR, 1998; MURA, *et al.*, 2001). Tais resultados são atribuídos ao efeito sinérgico de solubilização do polímero e da CD na formação do complexo ternário fármaco, ciclodextrina e polímero hidrossolúvel (CARRIER *et al.*, 2007).

Os polímeros hidrossolúveis podem interagir com as moléculas de fármaco, de CDs e com os complexos fármaco:CD (LOFTSSON, *et al.*, 1996). O mecanismo envolvido no aumento da eficiência de complexação das CD na presença dos polímeros hidrossolúveis não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que estes diminuem a mobilidade das CDs e aumentam a solubilidade dos complexos formados (VEIGA *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que a adição de polímeros hidrossolúveis é capaz de aumentar a biodisponibilidade de fármacos com uma redução de até 80% da quantidade de CD incorporada (LOFTSSON & FRIDRIKSDÓTTIR, 1998; MURA *et al.*, 2001).

Assim, o objetivo do presente trabalho é revisar este tema específico, abordando, sobretudo, aspectos relacionados à complexação de fármacos, ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis para otimização da quantidade de CDs, com finalidade de aumentar a solubilidade do fármaco e reduzir o volume das preparações.

2. Formação de complexos ternários

Quando um determinado polímero hidrossolúvel, uma CD e o fármaco são misturados em solução e assim obtidos complexos ternários, é possível alcançar uma maior solubilização do fármaco que quando o polímero e CD são utilizados separadamente, obtendo, dessa maneira, um efeito sinérgico (LOFTSSON *et al.*, 1994). As formulações contendo complexos fármaco:CD acrescidos de um polímero hidrossolúvel têm sido capazes de aumentar a biodisponibilidade de formulações com até 80% menos CD (LOFTSSON & FRIDRIKSDÓTTIR, 1998; MURA *et al.*, 2001). Na presença de água, o polímero linear auxilia a molhabilidade das partículas o que resulta na aceleração da dissolução e aumento da quantidade de fármaco liberado *in vitro* (LAHIANI-SKIBA *et al.*, 2006).

Este efeito sinérgico foi descrito, por exemplo, para a carbamazepina por Smith e colaboradores (2005) num complexo onde, além do fármaco, foi utilizada a sulfobutileter- β CD (SBE β CD) e, como polímero, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

Ribeiro e colaboradores (2003) citam a possível interação dos polímeros hidrossolúveis com moléculas de fármaco através de ligações eletrostáticas do tipo íon-íon, íon-dipolo e dipolo-dipolo, forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio.

A interação dos polímeros com CDs e complexos de fármaco:CD ocorre com a superfície externa da molécula de CD ou por inclusão das moléculas. As interações estabelecidas são do tipo Van der Waals e pontes de hidrogênio, formando agregados fármaco-CD-polímero (LOFTSSON, 1998; VALERO *et al.*, 2003). A FIGURA 1 demonstra a interação dos polímeros com as moléculas de CDs ou com os complexos fármaco:CD.

FIGURA 1. Representação da formação dos complexos ternários entre fármaco, ciclodextrina e polímero hidrossolúvel. FONTE: VEIGA *et al.*, 2006.

A estrutura química resultante das interações de fármaco, ciclodextrina e polímero hidrossolúvel permanece desconhecida, mas se reconhece que em solução aquosa os polímeros estabilizam micelas e outros tipos de agregados, diminuem a mobilidade das CDs e aumentam a solubilidade dos complexos através de alterações na hidratação das moléculas de CD e na estrutura tridimensional. Esse processo pode ser acelerado pelo aquecimento do sistema ternário (LOFTSSON *et al.*, 2005).

Assim, é possível acelerar a ativação das ligações entre os componentes do sistema durante a preparação dos complexos, mediante aquecimento realizado tanto em autoclave (120 a 140°C) durante 20 a 40 minutos, quanto em banho de ultrassom à temperatura superior a 30°C por 1 hora, ou ainda por aquecimento em microondas a 40°C durante 5 minutos (LOFTSSON *et al.*, 2005).

Os parâmetros termodinâmicos demonstram que diferentes forças e/ ou mecanismos estão envolvidos na formação do complexo, dependendo da presença ou ausência do polímero. A adição de polímeros altera a entropia (ΔS°) do sistema que se torna mais negativa, indicando a formação de uma estrutura com maior ordem (LOFTSSON *et al.*, 1994).

As diferenças estruturais e de polaridade das moléculas de CDs podem estabelecer diferentes tipos de interação com o polímero e o fármaco, e consequentemente, distinta eficiência de complexação. Na complexação de vinpocetina na presença de β CD e sulfobutileter- β CD (SBE β CD) foi avaliado o uso dos polímeros PVP e HPMC. Os melhores resultados de eficiência de complexação foram obtidos com o PVP na presença da β CD e HPMC quando usada a SBE β CD (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Por outro lado, os complexos ternários que utilizam derivados da CD, tais como a SBE β CD e hidroxipropil- β CD (HP β CD) podem apresentar resultados de dissolução maiores que os demais complexos que utilizaram as CDs naturais. A HP β CD é muito utilizada na área farmacêutica devido a sua forma amorfizada, alta solubilidade em água e habilidade de solubilização, além de ter baixo custo e baixa toxicidade (AMMAR *et al.*, 2006).

Levando em consideração os aspectos observados quanto à preparação dos complexos ternários, pode-se concluir que os polímeros hidrossolúveis interagem com as moléculas de CDs ou com os complexos binários formando uma cadeia linear de polímero entre os vários complexos binários. Estes complexos ternários adquirem melhor solubilidade que os correspondentes complexos binários, pois apresentam superiores valores de constante de estabilidade (VEIGA *et al.*, 2006).

3. Eficiência de complexação e constante de estabilidade

As CDs, os polímeros e os complexos fármaco:CD, segundo Loftsson e colaboradores (2007), formam agregados capazes de solubilizar fármacos e outras moléculas hidrofóbicas através de mecanismo do tipo micelar. Portanto, a constante de estabilidade (K_C) determinada a partir do diagrama de solubilidade de fases, é uma constante de estabilidade aparente para alguns complexos, descrevendo o efeito combinado de várias estruturas na solubilidade do fármaco. Sendo assim, a determinação da eficiência de complexação (EC) seria um método mais preciso para avaliar o efeito solubilizante das CDs.

A constante de estabilidade de um complexo é determinada a partir do declive e da solubilidade intrínseca do fármaco (S_0) em um meio de complexação (Equação 1). Teoricamente, o intercepto (S_{int}) do diagrama de solubilidade de fases seria idêntico a S_0 . No entanto, os fármacos com solubilidade aquosa menor que 0,1 mM, apresentam intercepto no diagrama de solubilidade de fases geralmente muito maior que a solubilidade intrínseca (S_{int}), resultando em valores imprecisos de K_C . Então, EC é calculada a partir do declive dos diagramas de solubilidade de fases e é independente de ambos, S_0 e S_{int} (Equação 2) (LOFTSSON *et al.*, 2007).

$$K_C = \frac{\text{Declive}}{S_0 \times (1 - \text{declive})} \quad (1)$$

$$EC = S_0 \cdot K_{1:1} = \frac{[F/CD]}{[CD]} = \frac{\text{Declive}}{(1 - \text{declive})} \quad (2)$$

Não há um consenso de quais os valores-limite de constante de estabilidade apresentam aplicabilidade nas formulações farmacêuticas. Alguns pesquisadores referem-se às constantes entre 200 e 5000 M^{-1} , enquanto outros obtiveram complexos de griseofulvina, nitrazepam, fenobarbital e vitamina K3 com diferentes CDs e constante de estabilidade entre 7 e 100 M^{-1} conferindo melhores propriedades físico-químicas que a forma não complexada (VEIGA *et al.*, 2006).

Os valores de K_C são muito utilizados para determinação da estequiometria dos complexos, bem como para comparar a afinidade dos fármacos às CDs e, conseqüentemente, verificar se na adição de polímeros

hidrossolúveis ao sistema ocorre maior interação entre os componentes (LOFTSSON *et al.*, 2007).

4. Polímeros utilizados na obtenção de complexos ternários

Os polímeros apresentam custo relativamente baixo e em função disso, vêm ganhando maior aplicabilidade na obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas e fármacos (LAHIANI-SKIBA *et al.*, 2006). Os requisitos mais importantes na escolha dos polímeros para formar complexos de inclusão com fármaco e CD são a hidrossolubilidade e ausência de atividade farmacológica. Os polímeros mais utilizados para este fim classificam-se em semi-sintéticos (representados pelos derivados da celulose), polissacarídeos ou polipeptídeos naturais e sintéticos (VEIGA *et al.*, 2006). A TABELA 1 demonstra exemplos dos polímeros mais utilizados para preparação de complexos ternários de inclusão.

TABELA 1. Polímeros mais utilizados na obtenção de complexos ternários de inclusão.

Natureza dos polímeros	Polímero
Natural	Pectina
	Mucina
	Agar
	Alginato de sódio
	Carrafenina
	Caseína
	Escleroglucano
	Gelatina

Semi-sintético	Metilcelulose (MC)
	Hidroxietilcelulose (HEC)
	Hidroxipropilcelulose (HPC)
	Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)
	Hidroxietilmetilcelulose (HEMC)
	Carboximetilcelulose (CMC)
Sintético	Povidona (PVP)
	Polietilenoglicol (PEG)
	Copovidona
	Polivinil álcool (PVA)

É interessante notar que não há uma faixa pré-estabelecida da concentração ideal de polímero para obtenção de complexos ternários. No entanto, sabe-se que, em altas concentrações, a viscosidade do meio aumenta, prejudicando a complexação (RIBEIRO *et al.*, 2003). A quantidade de polímero deve ser tal que o efeito solubilizante seja maximizado, mas insuficiente para causar um aumento significativo da viscosidade. Nos estudos de Loftsson e colaboradores (1994) com hidrocortisona, 17 β -estradiol e triancinolona em solução aquosa de HP β CD 10% (p/v), a concentração ideal de polímeros foi entre 0,05 e 0,25% (p/v) e maiores concentrações levaram à diminuição da solubilidade do fármaco.

Estudos demonstraram que HPMC e PVP aumentam a complexação da hidrocortisona, dexametasona e naproxeno com a β CD. Valero e colaboradores (2003) observaram que em baixas concentrações de PVP, o processo de complexação é dirigido entropicamente, já em maiores proporções é favorecido entalpicamente (AMMAR *et al.*, 2006).

Para obtenção de complexo ternário glimepirida:HP β CD:polímero, a dissolução do fármaco foi dependente da concentração de HPMC e PVP e o melhor resultado de solubilidade foi obtido empregando-se concentração de 20% de polímero. Entretanto, Ammar e colaboradores (2006a) verificaram que utilizando a β CD e PEG, a dissolução da glimepirida foi independente da concentração de polímero. Assim, a dissolução do fármaco pode estar relacionada ao quão as moléculas do complexo estão intimamente dispersas dentro da matriz polimérica através de interações entre o exterior do complexo e o polímero (AMMAR *et al.*, 2006a).

As diferenças estruturais e de polaridade que se estabelecem entre os componentes do sistema refletem-se nos valores de eficiência de complexação dos mesmos (RIBEIRO *et al.*, 2003). Alguns exemplos são demonstrados na TABELA 2.

TABELA 2. Solubilidade do fármaco sem ciclodextrina (S_0), no sistema ternário ($S_{\text{TERNÁRIO}}$) e Eficiência de Complexação (EC). Fonte: adaptado de BREWSTER & LOFTSSON, 2007.

Fármaco	Ciclodextrina ^a	Polímero ^b	S_0 (mg/mL) ^c	$S_{\text{TERNÁRIO}}$ (mg/mL) ^d	EC ^e
Acetazolamida	HP β CD	Ausente	0,64	3,60	0,197
	HP β CD	HPMC	0,90	4,40	0,356
	HP β CD	CMC	0,59	3,60	0,209
	HP β CD	PVP	0,94	3,70	0,273
Carbamazepina	HP β CD	Ausente	0,26	0,65	0,548
	HP β CD	HPMC	0,33	8,00	0,829
	HP β CD	CMC	0,18	8,40	0,709
	HP β CD	PVP	0,28	8,50	0,701

Finasterida	RM β CD	Ausente	0,06	12,30	0,708
	RM β CD	HPMC	0,06	11,60	0,789
	RM β CD	CMC	0,06	11,50	0,805
	RM β CD	PVP	0,06	11,60	0,844
Oxazepam	HP β CD	Ausente	0,05	2,10	0,109
	HP β CD	HPMC	0,27	2,10	0,076
	HP β CD	CMC	0,05	1,50	0,127
	HP β CD	PVP	0,10	1,40	0,115

^a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD); *Randomly methylated β -cyclodextrin* (RM β CD).

^b 0,10% (p/v) hidroxipropil metilcelulose (HPMC); 0,25% (p/v) carboximetilcelulose sódica (CMC); 0,25% (p/v) polivinilpirrolidona (PVP).

^c Solubilidade do fármaco no meio de complexação na ausência de CD.

^d Solubilidade do fármaco no meio de complexação na presença de polímero 10% (p/v) de CD.

^e Eficiência de complexação calculada de acordo com a Equação (2).

5. Aplicações farmacêuticas dos complexos ternários de inclusão

A maioria dos fármacos que não têm suficiente solubilidade aquosa, contém na formulação solventes orgânicos, emulsificantes e condições extremas de pH extremo, que podem causar irritação e outras reações adversas (DEL VALLE, 2004). Os complexos fármaco:CD:polímero podem ser administrados sob qualquer forma farmacêutica para o tratamento de uma variedade de situações, dependendo da atividade farmacológica do fármaco complexado. As pesquisas sobre os complexos ternários vêm ganhando destaque nas últimas décadas e é possível encontrar muitos estudos nos quais a obtenção de complexos fármaco:CD:polímero hidrossolúvel é descrita para vários fármacos (TABELA 3).

TABELA 3. Exemplos de fármacos complexados à ciclodextrinas e polímeros hidrossolúveis.

Fármaco	Ciclodextrina	Polímero Hidrossolúvel	Referência
17 β -Estradiol	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	HP β CD	PVP	LOFTSSON & BREWSTER, 1996
Acetazolamida	β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON & FRIDRILKSDÓTTIR, 1998
	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	HP β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 2005
Acetonido de triancinolona	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Alprazolam	β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON & FRIDRILKSDÓTTIR, 1998
	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Carbamazepina	SBE β CD	HPMC, PVP	SMITH <i>et al.</i> , 2005
	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON & FRIDRILKSDÓTTIR, 1998
	HP β CD	HPMC, CMC, PVP	BREWSTER & LOFTSSON, 2007
Celecoxib	HP β CD	HPMC, PEG, PVP	CHOWDARY & SRINIVAS, 2006
Clotrimazol	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Dexametasona	HP β CD	HPMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON & FRIDRILKSDÓTTIR, 1998
Diazepam	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994

Econazol	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Etoxizolamida	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON & FRIDRILKSDÓTTIR, 1998
Finasterida	RM β CD	HPMC, CMC, PVP	BREWSTER & LOFTSSON, 2007
Glibenclamida	β CD, HP β CD, SBE β CD	HPMC	SAVOLAINEN <i>et al.</i> , 1998
Glimepirida	β CD, HP β CD, SBE β CD	HPMC, PEG, PVP	AMMAR <i>et al.</i> , 2006a
Griseofulvina	α CD, β CD e γ CD	PEG	WULFF & ALDÉN, 1999
	β CD	CMC	DHANARAJU <i>et al.</i> , 1998
Hidrocortisona	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	HP β CD	HPMC, PVP	LOFTSSON & SIGURDARDOTTIR, 1994
	HP β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 2005
	RM β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 2005
Indometacina	α CD, β CD e γ CD	PEG	WULFF & ALDÉN, 1999
Metazolamida	β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON & FRIDRILKSDÓTTIR, 1998
	HP β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 2005
Miconazol	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Midazolam	SBE β CD	HPMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 2001
Naproxeno	β CD, HP β CD	PVP	MURA <i>et al.</i> , 2001

Nicardipino	β CD	PEG	QUAGLIA <i>et al.</i> , 2001
Oxazepam	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	HP β CD	HPMC, CMC, PVP	BREWSTER & LOFTSSON, 2007
Prednisolona	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	β CD	HPC	UEKAMA <i>et al.</i> , 1983
Progesterona	HP β CD	PEG	NANDI <i>et al.</i> , 2003
	β CD	PEG	LAHIANI-SKIBA <i>et al.</i> , 2006
	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Sulfametoxazol	HP β CD	CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
	β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON & FRIDRILKSDÓTTIR, 1998
	HP β CD	HPMC, CMC, PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 2005
Temazepam	HP β CD	CMC	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Terfenadina	β CD	CMC	CHOI <i>et al.</i> , 2001
Triclosan	β CD	CMC	LOFTSSON, 1999
Trimetoprima	HP β CD	PVP	LOFTSSON <i>et al.</i> , 1994
Tropicamida	HP β CD	HPMC, CMC, PVP	CAPPELLO <i>et al.</i> , 2001
Vinpocetina	β CD, SBE β CD	HPMC, PVP	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2003

A adição de polímeros hidrossolúveis poderá aumentar a biodisponibilidade de muitos fármacos e consequentemente será maior a permeabilidade desses fármacos através de membranas biológicas. Supondo que o fármaco seja melhor absorvido pelo organismo, a eficiência terapêutica é aumentada podendo em certos casos levar a redução da dose terapêutica para que seja exercido o mesmo efeito (CARRIER *et al.*, 2007).

Referências bibliográficas

AMMAR, H.O.; SALAMA, H.A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Implication of inclusion complexation of glimepiride in cyclodextrin-polymer systems on its dissolution, stability and therapeutic efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 320, p. 53-57, 2006.

AMMAR, H.O.; SALAMA, H.A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 309, p. 129-138, 2006a.

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

CAPPELLO, B.; CARMIGNANI, C.; IERVOLINO, M.; IMMACOLATA LA ROTONDA, M.; FABRIZIO SAETTONE, M. Solubilization of tropicamide by hydroxypropyl- β -cyclodextrin and water-soluble polymers: in vitro/in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 213, p. 75-81, 2001.

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. v. 123, p. 78-99, 2007.

CHOI, H.G.; LEE, B.J.; HAN, J.H.; LEE, M.K.; PARK, K.M.; YONG, C.S.; RHEE, J.D.; KIM, Y.B.; KIM, C.K. Terfenadine- β -cyclodextrin inclusion complex with antihistaminic activity enhancement. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 27, p. 857-862, 2001.

CHOWDARY, K.P.R.; SRINIVAS, S.V. Influence of hydrophilic polymers on celecoxib complexation with hydroxypropyl β -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech*. v. 7, n. 3, 2006.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrin and their uses: a review. *Process Biochemistry*. v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DHANARAJU, M.D.; KUMARAN, K.S.; BASKARAN, T.; SREE RAMA MOORTHY, M. Enhancement of bioavailability of griseofulvin by its complexation with β -cyclodextrin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 24, p. 583-587, 1998.

LAHIANI-SKIBA, M.; BARBOT, C.; BOUNOURE, F.; JOUDIEH, S.; SKIBA, M. Solubility and dissolution rate of progesterone-cyclodextrin-polymer systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 32, p. 1043-1058, 2006.

LOFTSSON, T.; SIGURDARDÓTTIR, A. M. The effect of hydroxypropyl methylcellulose on hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its permeability through hair mouse skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 2, p. 297-301, 1994.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H.; SIGURDARDÓTTIR, A. M.; UEDA, H. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 110, p. 169-177, 1994.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins*. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H.; GUDMUNDSDÓTTIR, T.K. The effect of water-soluble polymers on aqueous solubility of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 127, p. 293-296, 1996.

LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of a water-soluble polymers. *Pharmazie*. 53, 733-740, 1998.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 163, p. 115-121, 1998.

LOFTSSON, T. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 88, p. 1254-1258, 1999.

LOFTSSON, T.; GUDMUNDSDÓTTIR, H.; SIGURJÓNSDÓTTIR, J.F.; SIGURDSSON, H.H.; SIGFÚSSON, S.D.; MÁSSON, M.; STEFÁNSSON, E. Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: formulation of midazolam nasal spray. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 212, p. 29-40, 2001.

LOFTSSON, T.; SIGURDSSON, H.H.; MÁSSON, M.; SCHIPPER, N. Preparation of solid drug/cyclodextrin complexes of acidic and basic drugs. *Pharmazie*. v. 59, p. 25-29, 2004.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Effect of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 302, p. 18-28, 2005.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemical*. v. 57, p. 545-552, 2007.

MURA, P.; FAUCCI, M.T.; BETTINETTI, G.P. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 13, p. 187-194, 2001.

NANDI, I.; BATESON, M.; BARI, M.; JOSHI, H. N. Synergistic effect of PEG-400 and cyclodextrin in enhance solubility of progesterone. *AAPS PharmSciTech.* v. 4, p. 1-5, 2003.

QUAGLIA, F.; VARRICHIO, G.; MIRO, A.; IMMACOLATA LA ROTONDA, M. LAROBINA, D.; MENSITIERI, G. Modulation of drug release from hydrogels by using cyclodextrins: The case of nicardipine/ β -cyclodextrin system in crosslinked polyethyleneglycol. *Journal of Controlled Release.* v. 71, p. 329-337, 2001.

RIBEIRO, L.S.S.; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vipocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* v. 20. p. 253-266, 2003.

SAVOLAINEN, J.; JÄRVINEN, K.; TAIPALE, H.; JARHO, P.; LOFTSSON, T.; JÄRVINEN, T. Co-administration of a water-soluble polymer increases the usefulness of cyclodextrins in solid oral dosage forms. *Pharmaceutical Research.* v. 15, p. 1696-1701, 1998.

SMITH, J.S.; MACRAE, R.J.; SNOWDEN, M.J. Effect of SBE7- β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from sustained release beads. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* v. 60, p. 73-80, 2005.

UEKAMA, K.; OTAGIRI, M.; UEMURA, Y.; FUJINAGA, T.; ARIMORI, K.; MATSUO, N.; TASAKI, K.; SUGII, A. Improvement in oral bioavailability of prednisolone by β -cyclodextrin complexation in humans. *Journal of pharmacobio-dynamics.* v. 6, p. 124-127, 1983.

VALERO, M.; CARRILLO, C.; RODRÍGUEZ, L.J. Ternary naproxen: β -cyclodextrin:polyethylene glycol complex formation. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 265, p. 141-149, 2003.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. *As Ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica*. Coimbra: Ed. MinervaCoimbra, 2006.

WULFF, M. & ALDÉM, M. Solid state of drug-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000 prepared by a new method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 8, p. 169-281, 1999.

Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA DE BENZNIDANOL

RESUMO

O benznidazol (BNZ) é o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento específico da doença de Chagas, considerada uma doença endêmica que atinge a América Latina. Com o objetivo de conhecer as propriedades físicas e químicas da molécula de BNZ realizou-se nesse estudo a caracterização do fármaco e desenvolvimento de um ensaio de dissolução intrínseca. Foram realizadas análises de solubilidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), investigação de novas formas cristalinas e a definição dos parâmetros para o ensaio de dissolução intrínseca. Os resultados mostraram que o BNZ é mais solúvel em lauril sulfato de sódio. A curva DSC apresentou comportamento típico de fármaco cristalino com evento de fusão bem definido em 191,78°C e na curva TGA a temperatura de termodecomposição de 249,47°C. Observou-se formação de uma nova forma cristalina do fármaco com diferente morfologia e menor solubilidade. No desenvolvimento do ensaio de dissolução intrínseca foram definidos os parâmetros mais adequados para realização do mesmo.

Palavras-chave: Benznidazol, Caracterização físico-química, Dissolução intrínseca.

1. Introdução

A doença de Chagas é considerada uma doença endêmica que atinge a América Latina, prejudicando gravemente a saúde dos indivíduos infectados. Estima-se prevalência de 15 milhões de casos, distribuídos em 21 países. Aproximadamente 28 milhões de pessoas sofrem o risco de contrair a infecção (WHO, 2006).

O benznidazol (BNZ) - FIGURA 1 - um derivado nitroimidazólico, apresenta-se comercialmente na forma de comprimidos de 100 mg, sendo o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento específico da doença de Chagas (DEF, 2007/2008). Devido aos sérios efeitos colaterais, como náusea, vômito, dermatopatia, dor abdominal, neuropatia periférica, discrasias sangüíneas e severas reações na pele durante o tratamento com BNZ, os pacientes, muitas vezes, interrompem o tratamento (MARTINDALE, 2007; LAMAS *et al.*, 2006).

FIGURA 1. Estrutura química do BNZ

O BNZ revela-se um composto de baixa hidrossolubilidade (MORILLA *et al.*, 2002 e LAMAS *et al.*, 2006). Para fármacos relativamente insolúveis em água a dissolução pode ser um fator limitante na absorção, comprometendo assim, sua biodisponibilidade (ANSEL *et al.*, 2000; AULTON, 2005).

A velocidade de dissolução intrínseca vem sendo largamente empregada na caracterização de fármacos, podendo determinar parâmetros termodinâmicos associados à transição de fase cristalina, na investigação do

fenômeno de transferência de massa durante o processo de dissolução, na determinação dos perfis de dissolução-pH e também conhecer a relação entre a porcentagem de dissolução e a forma cristalina (YU *et al.*, 2004).

A forma cristalina e a estrutura interna de um fármaco podem afetar suas propriedades físico-químicas. O polimorfismo é a propriedade de um composto químico de adotar uma ou mais formas cristalinas ou uma forma amorfa com características distintas do mesmo composto, sob condições induzidas de cristalização (ANSEL, *et al.*, 2000; VIPPAGUNTA, *et al.*, 2001).

O conhecimento das propriedades físicas e químicas da molécula de um fármaco tem um papel significativo no desenvolvimento de uma formulação, quer sejam líquidas, semi-sólidos ou sólidos (AULTON, 2005). Dados relativos à caracterização físico-química do benznidazol não são citados na literatura. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi a caracterização físico-química do BNZ e desenvolvimento de um ensaio de dissolução intrínseca adequado para o fármaco.

2. Material e Métodos

2.1 Materiais

Foi utilizado BNZ grau farmacêutico, gentilmente cedido por Roche Farmacêutica (Brasil) empregado como substância química de referência. Solventes e reagentes de grau analítico foram empregados.

2.2 Espectro de absorção no UV

Uma solução de BNZ (substância química referência) em água foi submetida a varredura na região do ultravioleta de 200 a 400 nm em espectrofotômetro Beckman Coulter, DU 640 (EUA).

2.3 Curva analítica

O BNZ (20mg) foi dissolvido em 200 mL de água destilada sob vigorosa agitação e em seguida submetido ao banho de ultra-som Unique, modelo USC-2800 (Brasil), durante 20 minutos.

A solução obtida foi diluída em água nas concentrações de BNZ de 11,56 a 62,40 $\mu\text{g/mL}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Beckman Coulter, DU 640 (EUA) em comprimento de onda de 324 nm. Os valores obtidos foram plotados (absorbância *versus* concentração) e equação da reta e o coeficiente de correlação de Person (R^2) gerados a partir da regressão linear dos dados.

2.4 Solubilidade

A solubilidade do fármaco foi obtida pelo método do equilíbrio (AULTON, 2005; BARTOLOMEI *et al.*, 2006), no qual um excesso de BNZ foi adicionada a 10 mL de meio e as suspensões submetidas à agitação em incubadora Tecnal, TE 420 (Brasil) a 200 rpm por 72 horas à temperatura de 37°C. Na sequência, as amostras foram filtradas e analisadas por espectrofotometria ultravioleta a 324 nm.

Os meios usados no ensaio de solubilidade foram: água, HCl 0,1N, HCl 0,01N, tampão fosfato pH 4,5, 6,8 e 7,2, suco gástrico simulado pH 1,2, lauril sulfato de sódio de 0,05% a 1,0% em água.

2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A amostra do fármaco foi submetida à análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) em calorímetro TA Instruments, DSC 2920 (EUA) sob atmosfera inerte de N_2 com fluxo de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ na razão de aquecimento

de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ na faixa de 30 a 240°C , utilizando-se 2 a 3 mg de BNZ em cadinho de alumínio hermeticamente fechado.

2.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram efetuadas em equipamento TA Instruments, TGA 2950 (EUA). As amostras foram pesadas em cadinho de platina (8 a 15 mg) e analisadas sob atmosfera inerte de N_2 com fluxo de 50 mL/min e razão de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ na faixa de 30 a 390°C .

2.7 Recristalização do fármaco

2.7.1 Obtenção de cristais

Pesou-se 500 mg de BNZ e dissolveu-se em 160 mL de álcool etílico com auxílio do banho de ultra-som Unique, modelo USC-2800 (Brasil) durante 20 minutos. Retirou-se 40 mL dessa solução e adicionou-se 60 mL de água. Essa solução foi armazenada em geladeira por 48 horas. Após, procedeu-se a filtração e a amostra secada por 24 horas em estufa com circulação forçada de ar Fabbe-Primar (Brasil) a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.7.2 Caracterização dos cristais

Os cristais foram visualizados por meio de microscopia ótica, com microscópio Motic® MLC-150C (China) e câmera fotográfica digital FUJIFILM FinePix (Japão) acoplada com aumento total de 10 vezes.

Ensaio de DSC foram realizados em calorímetro TA Instruments, DSC 2920 (EUA) sob atmosfera inerte de N_2 com fluxo de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ na faixa de 30 a 240°C , utilizando-se 2 a 3 mg do cristal. A avaliação da solubilidade dos cristais procedeu-se de acordo com o método do equilíbrio, descrito anteriormente no item 2.4.

Para análise de infravermelho foram preparadas pastilhas de KBr (brometo de potássio) contendo os cristais ou fármaco (substância química de referência), preparados em gral de ágata na proporção 1:3, prensadas com força de 0,5 toneladas por 4 minutos e submetidas a varredura na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}), empregando equipamento FITR-BOMEM Michelsson Hartman & Braun MB-100 (Alemanha).

2.8 Dissolução Intrínseca

Os ensaios de dissolução intrínseca foram realizados segundo recomendações da Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007), empregando aparato de dissolução intrínseca do tipo disco. Sobre o orifício do disco foram depositados 100 mg de BNZ, sendo compactado por 1 minuto em prensa, sob força de compressão de 1000, 2000 e 3000 psi. Parte das pastilhas foram pulverizadas e submetidas a ensaios de DSC para avaliar o comportamento térmico do fármaco quando submetido a diferentes forças de compressão.

Depois de compactado foram realizados ensaios de dissolução intrínseca em aparelho de dissolução Vankel, VK 7010 (EUA) por um período de 24 horas, com intervalos de coleta de 30 minutos. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis Cary (EUA) em comprimento de onda de 324 nm.

O meio de dissolução foi selecionado baseando-se nos resultados do ensaio de solubilidade. O pH do meio de dissolução foi avaliado ao início e término dos ensaios.

A velocidade de rotação das hastes foram de 50, 75 e 100 rpm. A velocidade de dissolução intrínseca foi determinada plotando os dados da razão da quantidade dissolvida (Q) nos intervalos de coleta e área da superfície exposta ($0,5\text{ cm}^2$) em função do tempo (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

3. Resultados e Discussão

A FIGURA 2 apresenta o espectro de absorção na região ultravioleta (200 a 400 nm) obtido para BNZ em água purificada.

FIGURA 2. Espectro de absorção na região do ultravioleta (200 a 400 nm) da solução padrão secundário de BNZ em água purificada.

O espectro de absorção do BNZ na região ultravioleta mostrou absorção máxima no comprimento de onda de 324 nm, sendo este utilizado para a quantificação do fármaco.

FIGURA 3. Curva analítica obtida a partir de soluções de BNZ em água nas concentrações de 11,56 a 62,40 $\mu\text{g/mL}$ submetidas à leitura espectrofotométrica no UV em 324 nm.

A curva analítica obtida mostrou-se linear no intervalo 11,56 a 62,40 µg/mL, apresentando coeficiente de correlação de Person (R^2) de 0,9994. A FIGURA 4 demonstra a solubilidade do BNZ frente aos meios empregados neste estudo.

FIGURA 4. Valores de solubilidade de BNZ (mg/mL) em água purificada, HCl 0,1N, HCl 0,01N, tampão fosfato pH 4,5, 6,8 e 7,2, suco gástrico simulado pH 1,2 e LSS (0,05 a 1,0%).

Maior solubilidade de BNZ (mg/mL) foi observada nos meios que continham lauril sulfato de sódio (LSS) e ácido clorídrico (HCl). Para avaliar a possibilidade de efeito sinérgico desses dois meios, realizaram-se ensaios de solubilidade com as concentrações demonstradas na FIGURA 5.

FIGURA 5. Valores de solubilidade de BNZ em HCl, lauril sulfato de sódio e sistemas solventes formados pela combinação de ambos.

A combinação dos solventes não mostrou alteração significativa sobre a solubilização do BNZ. Dessa forma, optou-se pelo uso de LSS 0,1% como o meio de dissolução do BNZ, por apresentar solubilidade suficiente para estabelecer a condição *sink* em um ensaio de dissolução, além da facilidade de trabalho pelo uso de menor concentração de tensoativo no meio.

A FIGURA 6 mostra o comportamento térmico do BNZ. A curva DSC apresentou evento endotérmico de fusão do BNZ em 191,78°C. O tratamento da curva DSC permitiu a determinação da pureza do fármaco (99,3%).

FIGURA 6. Curvas termoanalíticas de DSC e TGA de BNZ obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento $10^\circ C \cdot min^{-1}$ (DSC) e $20^\circ C \cdot min^{-1}$ (TGA) na faixa de 30 a $390^\circ C$.

Segundo Figueiras (2007) o evento exotérmico na curva DSC em $286,79^\circ C$ poderia referir-se à decomposição térmica de fármaco. No entanto, este evento pode estar relacionado à transição vítrea do BNZ, conforme comportamento calorimétrico de alguns fármacos citados por Villaverde (2005).

A análise termogravimétrica (TGA) permite determinar as perdas de massa que se produzem no fármaco quando submetido ao aquecimento. A curva TGA mostrou grande estabilidade térmica entre 30 e $210^\circ C$, seguida de perda de massa acentuada em $249,47^\circ C$ (T_{onset}), possivelmente associada à termod decomposição do BNZ.

Durante os estudos de caracterização de um fármaco a investigação da presença de polimorfos é muito importante, já que cristais diferentes podem apresentar propriedades físico-químicas muito distintas entre si, sendo capazes de influenciar a estabilidade e biodisponibilidade do fármaco (ANSEL, *et al.*, 2000; LACHMAN, *et al.*, 2001).

A morfologia do BNZ (substância química de referência) e material obtido após recristalização é mostrado na FIGURA 7.

FIGURA 7. Microscopia ótica do BNZ (a) e após sua recristalização (b) com aumento de 10 vezes.

Observando a FIGURA 7 é possível verificar a mudança para a forma de cristais aciculares bem definidos (b). A solubilidade aquosa do cristal de BNZ obtido foi de 0,17 mg/mL. Sendo assim, a recristalização originou uma estrutura menos solúvel que o fármaco analisado inicialmente. O comportamento térmico da amostra de BNZ obtida por recristalização é mostrado na FIGURA 8.

FIGURA 8. Curvas DSC de BNZ e do cristal, obtidos sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Somente pequena alteração no comportamento térmico da amostra foi observada quando comparado com o fármaco BNZ (substância química de

referência). O fármaco com temperatura de fusão em 191,78°C e T_{onset} 189,69°C e a amostra obtida após recristalização com evento endotérmico em 191,42°C e T_{onset} 189,78°C permitem inferir uma estrutura cristalina possivelmente semelhante entre o fármaco inicial e a amostra recristalizada.

O espectro de IV obtido da amostra de BNZ e de sua recristalização pode ser observado na FIGURA 9. Não houve modificações nas bandas de absorção do fármaco após recristalização.

FIGURA 9. Espectro de absorção na região do infravermelho médio da amostra de BNZ (a) e após sua recristalização (b).

Segundo a Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007) a condição *sink* deve ser mantida durante o ensaio de dissolução. O meio lauril sulfato de sódio 0,1% foi empregado no ensaio de dissolução intrínseca já que melhor reproduziu condições *sink*. O emprego de LSS em concentração maior que 0,1% mostrou melhor solubilização do fármaco (FIGURA 4), entretanto, o emprego de grandes quantidades de tensoativo não é recomendado já que altera as condições hidrodinâmicas do meio. O volume de 1000 mL de meio foi escolhido para atender o parâmetro descrito para condições *sink* no qual o volume de meio deve ser 2 – 10 vezes maior que a solubilidade intrínseca do fármaco.

A FIGURA 10 mostra as curvas DSC das pastilhas de BNZ obtidas sob as forças de compressão de 1000, 2000 e 3000 psi.

FIGURA 10. Curvas DSC referentes ao BNZ não compactado e sob forças de compressão de 1000, 2000 e 3000 psi, obtidas através de atmosfera de N_2 ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ na faixa de 30 a 240°C .

A TABELA 1 mostra os valores de temperatura de fusão e temperatura inicial de fusão (T_{onset}) para as pastilhas de BNZ obtidas nas diferentes forças de compressão.

TABELA 1. Valores de temperatura de fusão e temperatura inicial de fusão (T_{onset}) de BNZ obtidos a partir da análise de DSC com forças de compressão de 1000, 2000 e 3000 psi.

FORÇA DE COMPRESSÃO (psi)	TEMPERATURA DE FUSÃO ($^\circ\text{C}$)	T_{onset} ($^\circ\text{C}$)
1000	191,50	190,53
2000	191,50	190,17
3000	191,39	190,19

Não se observou significativa alteração nos valores de temperatura de fusão e temperatura inicial de fusão foi observada para as diferentes forças de compressão estudadas.

A influência das forças de compressão 1000, 2000 e 3000 psi na velocidade de dissolução intrínseca está representada na FIGURA 11.

FIGURA 11. Efeito da força de compressão de 1000, 2000 e 3000 psi sobre a velocidade de dissolução intrínseca de BNZ no meio de dissolução lauril sulfato de sódio 0,1%, volume de meio de 1000 mL e velocidade de rotação de 75 rpm.

A dissolução intrínseca do BNZ mostrou-se semelhante nas forças de compressão empregadas. Assim, selecionou-se 2000 psi para a obtenção das pastilhas nos ensaios de dissolução intrínseca do fármaco, pois é a força de compressão mais utilizada na produção de comprimidos é de 2000 psi (YU, *et al.*, 2004).

A velocidade de rotação da haste do aparato de dissolução tem papel fundamental na dissolução do fármaco, já que altera o equilíbrio hidrodinâmico do meio. Após já estabelecidos o volume de meio e a melhor força de compressão, ensaios foram desenvolvidos empregando esses parâmetros e a velocidade de rotação da haste do aparato de dissolução foi avaliada nas velocidades de 50, 75 e 100 rpm. A FIGURA 12 mostra os ensaios de dissolução intrínseca para o BNZ usando diferentes velocidades de rotação da haste do aparato tipo disco.

FIGURA 12. Dissolução intrínseca de BNZ com velocidade de rotação de 50, 75 e 100 rpm no ensaio realizado no meio lauril sulfato de sódio 0,1%, volume de 1000 mL e força de compressão de 2000 psi.

A velocidade de dissolução intrínseca foi determinada pelo declive de cada regressão linear. Nas rotações empregadas, a velocidade de dissolução intrínseca foi de 0,0298 mg/min/cm² para 50 rpm, 0,0347 mg/min/cm² para 75 rpm e 0,0401 mg/min/cm² para 100 rpm. Considerando que o BNZ é um fármaco de baixa solubilidade e que as três velocidades de rotação testadas apresentaram baixos valores, optou-se pela maior rotação, ou seja, 100 rpm.

Geralmente há uma correlação qualitativa na avaliação de solubilidade e dissolução intrínseca. É proposto o valor limite de 0,1 mg/min/cm² para classificar em alta ou baixa velocidade de dissolução intrínseca. Para fármacos com resultados abaixo de 0,1 mg/min/cm² são considerados de baixa solubilidade e podem apresentar uma absorção dependente da dissolução (YU, *et al.*, 2004; AULTON, 2005).

Na avaliação da solubilidade a dose é considerada, enquanto a dissolução intrínseca não considera o efeito da dose. Quando a dose for extremamente alta (maior ou igual a 1000 mg) ou baixa (menor ou igual a 1

mg) pode ocorrer discrepância entre a classificação de solubilidade e a dissolução intrínseca (YU, *et al.*, 2004).

4. Conclusão

A partir da caracterização do BNZ, foi possível verificar que o fármaco apresenta melhor solubilidade em lauril sulfato de sódio. O perfil calorimétrico, verificado através da curva de DSC, demonstrou evento de fusão em 191,78°C e na análise termogravimétrica termodecomposição em 249,47°C. Além desses, houve formação de uma nova forma cristalina do fármaco com diferente morfologia e menor solubilidade

No desenvolvimento do ensaio de dissolução intrínseca foram definidos os parâmetros mais adequados para realização do mesmo, tais como, força de compressão de 2000 psi, velocidade de rotação de 100 rpm, meio de dissolução LSS 0,1% e volume do meio de 1000 mL. A velocidade de dissolução intrínseca do BNZ, obtida nesse estudo, foi de 0,0401 mg/min/cm², sendo classificado como um fármaco com baixa velocidade de dissolução intrínseca

Referências bibliográficas

ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., ALEN, L.V. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier. 2000.

AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2^o ed. Porto Alegre. Artmed. 2005.

BARTOLOMEI, M.; BERTOCCHI, PAOLA; ANTONIELLA, E. RODOMONTE, A. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form diclofenac sodium: comparasion with anhydrous form. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 40, p. 1105-1113, 2006.

DEF, Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. 36^o edição. São Paulo. Editora de Publicações Científicas. 2007/2008.

FIGUEIRAS, A.F.; CARVALHO, R.A.; RIBEIRO, L.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; VEIGA, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 67, p. 531-539, 2007.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.I, p.303-311.

LAMAS, M.C.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMÓN, C. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*. V. 307, p. 239-243, 2006.

MARTINDALE. 35 Ed. Pharmaceutical Press, 2007. p. 747.

MORILLA, M.J.; BENAVIDEZ, P.; LOPEZ, M.O.; BAKAS, L.; ROMERO, E.L. Development and in vitro characterisation of a benznidazole liposomal formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249, p. 89-99, 2002.

UNITED States Pharmacopeia. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convenvion, 2007. v. 30 (6), p. 2130.

VILLAVERDE, J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J.I.; MAQUEDA, C.; GINÉS, J.M.; MORILLO. Inclusion complexes of α - and γ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterization. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. *Chemosphere*. v. 60, p. 656-664, 2005.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 48, p. 3-26, 2001.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. TDR Strategic Direction: Chagas disease. WHO. Geneva, 2006. Disponível em: http://www.who.int/tdr/publication/publication/pdf/swg_chagas.pdf. Acesso em 02 de agosto de 2008.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. International Journal of Pharmaceutics. v.270, p. 221-227, 2004.

Capítulo 3

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS BINÁRIOS CONTENDO BENZNIDAZOL E CICLODEXTRINAS

RESUMO

O presente trabalho teve por finalidade obter e caracterizar complexos binários de BNZ e CDs (α CD, β CD e γ CD) com o intuito de melhorar a solubilidade do fármaco. Os complexos binários foram preparados na proporção estequiométrica 1:1 entre BNZ e CD e secos em estufa. Outros dois métodos de preparo – co-evaporação e liofilização – foram empregados para comparação e escolha do mais adequado. Para caracterização dos complexos efetuou-se ensaios de solubilidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA). O fármaco apresentou maior interação com a β CD, obtendo solubilidade de 0,5 mg/mL. Houve aumento na solubilidade quando este complexo foi preparado por co-evaporação (0,80 mg/mL) e liofilização (0,84 mg/mL). As curvas DSC dos complexos apresentaram redução do evento endotérmico de fusão do fármaco e as curvas termogravimétricas, deslocamento da termodecomposição para temperatura mais elevada, sugerindo a formação de um complexo de inclusão mais estável.

Palavras-chave: Benznidazol, Complexo binário, Ciclodextrina, Solubilidade

1. Introdução

A doença de Chagas é considerada uma doença endêmica que atinge a América Latina, prejudicando gravemente a saúde dos indivíduos infectados. Estima-se prevalência de 15 milhões de casos, distribuídos em 21 países. Aproximadamente 28 milhões de pessoas sofrem o risco de contrair a infecção (WHO, 2006).

O benznidazol (BNZ) é o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento específico da doença de Chagas. Apresenta baixa solubilidade em água e isso pode proporcionar absorção incompleta ou irregular. Demonstra sérios efeitos colaterais e baixa eficácia na fase crônica da doença (MORILLA *et al.*, 2002; MARTINDALE, 2007), entretanto, é o único fármaco disponível no Brasil para a terapêutica da doença de Chagas.

Uma tecnologia reconhecidamente eficaz para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis é a utilização das ciclodextrinas (CD), uma vez que os complexos de inclusão obtidos têm demonstrado uma melhora na estabilidade química, aumento na solubilidade aquosa, dissolução, e conseqüentemente na biodisponibilidade dos fármacos encapsulados (SMITH *et al.*, 2005; VEIGA *et al.*, 2006; CARRIER *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

A forma tronco-cônica que as CDs apresentam é devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas e a conformação em cadeira apresentadas pelas unidades de glicose. Assim, a cavidade central da CD promove um microambiente lipofílico com adequado tamanho para que as moléculas de fármacos possam ser incluídas. Já os grupos hidroxilas orientam-se para o exterior do cone, tornando a superfície externa das CDs hidrofílica (DEL VALLE, 2004; VEIGA *et al.*, 2006; CARRIER *et al.*, 2007).

O requisito para que um processo de complexação ocorra depende essencialmente da complexibilidade da molécula do fármaco à cavidade da CD,

relacionado à compatibilidade estérica entre ambos, a polaridade do fármaco e as interações termodinâmicas entre os componentes do sistema (BIBBY *et al.*, 2000; DEL VALLE, 2004).

Considerando essa capacidade das CDs de encapsular determinadas moléculas e aumentar a solubilidade de compostos pouco solúveis, o presente trabalho tem por finalidade obter e caracterizar complexos binários de benznidazol e ciclodextrinas (α CD, β CD e γ CD) com a finalidade de melhorar a solubilidade do fármaco.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Foi utilizado BNZ gentilmente cedido por Roche Farmacêutica (Brasil) com grau de pureza de 99,33%. As ciclodextrinas empregadas nesse estudo foram α -ciclodextrina (Cawamax W6), β -ciclodextrina (Cawamax W7) e γ -ciclodextrina (Cawamax W8) gentilmente cedidas pela ISP - International Specialty Products (Brasil).

2.2 Solubilidade de fases

Um excesso de fármaco foi adicionado a um volume constante de diferentes concentrações de CD (5, 10, 15 e 20 mM) e as suspensões obtidas foram submetidas ao equilíbrio em incubadora orbital Tecnal, TE420 (Brasil) na velocidade de 200 rpm por 72 horas a temperatura de 37°C. Após esse período, as amostras foram filtradas, apropriadamente diluídas e analisadas em espectrofotômetro Beckman Coulter, DU640 (EUA) a 324 nm. As medidas foram realizadas em duplicata.

A constante de estabilidade aparente (K_C) foi calculada de acordo com Higuchi e Connors (1965) a partir da porção linear do diagrama de solubilidade, segundo a equação 1:

$$K_C = \frac{\text{Declive}}{S_0 \times (1 - \text{declive})} \quad (1)$$

Onde K_C é a constante de estabilidade e S_0 é a solubilidade intrínseca do fármaco.

2.3 Eficiência de Complexação (EC)

A EC foi calculada a partir do declive do diagrama de solubilidade de fases, de acordo com a seguinte equação (LOFTSSON *et al.*, 2007):

$$EC = S_0 \cdot K_{1:1} = \frac{[F/CD]}{[CD]} = \frac{\text{Declive}}{(1 - \text{declive})} \quad (2)$$

Onde $[F/CD]$ é a concentração do complexo dissolvido, $[CD]$ é a concentração de ciclodextrina livre dissolvida e o Declive obtido do diagrama de solubilidade de fases.

A EC foi usada para calcular a razão molar entre fármaco (F) e ciclodextrina (CD) empregando-se a Equação (3) descrita abaixo (LOFTSSON *et al.*, 2007):

$$F:CD = 1 : \left(1 + \frac{1}{EC} \right) \quad (3)$$

2.4 Preparação das misturas físicas

As misturas físicas de BNZ/ α CD, BNZ/ β CD e BNZ/ γ CD foram preparadas na proporção estequiométrica 1:1 e os componentes totalmente misturados. Posteriormente, as misturas físicas foram utilizadas como referência nos estudos de caracterização dos complexos de inclusão.

2.5 Preparação dos complexos de inclusão

Complexos binários foram preparados na proporção estequiométrica 1:1 entre BNZ e CD (α , β e γ), usando a secagem em estufa. Baseando-se nos resultados obtidos, dois novos métodos de preparo – co-evaporação e liofilização – foram empregados para comparação e escolha do mais adequado.

2.5.1 Secagem em estufa

O BNZ e a ciclodextrina (α CD, β CD e γ CD) foram dispersos (separadamente) em água destilada, posteriormente reunidos em um mesmo recipiente permanecendo sob agitação magnética em agitador Speedlab Nalgon (Brasil) por 48 horas à temperatura ambiente. A secagem do material foi realizada em estufa com circulação forçada de ar Fabbe-Primar (Brasil) à 45°C por 48 horas.

2.5.2 Método de co-evaporação

Uma dispersão de BNZ em metanol foi adicionada sobre uma dispersão aquosa de β CD. O sistema assim formado foi submetido à agitação magnética em agitador Speedlab Nalgon (Brasil) por 48 horas à temperatura ambiente. Após o equilíbrio, a suspensão foi levada ao rotaevaporador Tecnal, TE 210 (Brasil) com bomba de vácuo Millipore (EUA) a 50°C por 2 horas para eliminar o solvente. A secagem final do material foi realizada em estufa com circulação forçada de ar Fabbe-Primar (Brasil) à 45°C por 48 horas.

2.5.3 Método de liofilização

No processo de liofilização, o BNZ e a β CD foram dispersos em água destilada separadamente. Em seguida, reunidos em um mesmo recipiente, permanecendo sob agitação magnética em agitador Speedlab Nalgon (Brasil) por 48 horas à temperatura ambiente. O material obtido foi congelado por imersão em banho de etanol e gelo seco e, em seguida, liofilizado em equipamento Savant Modulyo a -40°C por 48 horas.

2.6 Caracterização dos complexos de inclusão

2.6.1 Solubilidade

Procedeu-se conforme o método de equilíbrio já descrito no ensaio de solubilidade de fases. As análises foram realizadas em duplicata.

A razão dose/solubilidade (D/S) foi calculada seguindo a Equação 4:

$$D/S = \frac{\text{dose (mg)}}{\text{Solubilidade aquosa (mg/mL)}} \quad (4)$$

2.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises térmicas foram efetuadas usando equipamento TA Instruments, DSC 2920 (EUA) para as amostras de BNZ e complexos binários obtidos, empregando razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, na faixa de 30 a 240°C , em atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$) e células de alumínio seladas, com massa entre 2 e 3 mg.

2.6.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As amostras dos complexos de inclusão foram pesadas, transferidos para célula de platina (8 a 15 mg) e analisados sob atmosfera inerte de N_2 com fluxo de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $20^\circ\text{C}/\text{minuto}$ na faixa de 30 a 600°C , em equipamento TA Instruments, TGA 2950 (EUA).

3. Resultados e discussão

O método de solubilidade de fases é habitualmente utilizado para verificação da formação de complexos de inclusão em solução (BREWSTER & LOFTSSON, 2007). O diagrama de solubilidade de fases, observado na FIGURA 1, representa o modelo de equilíbrio que se estabeleceu durante a formação dos complexos BNZ e αCD , βCD e γCD .

FIGURA 1. Diagrama de solubilidade de fases dos sistemas BNZ: αCD , BNZ: βCD e BNZ: γCD .

A curva de solubilidade obtida apresenta um aumento linear da solubilidade do benznidazol em função do aumento da concentração de ciclodextrinas e, portanto, exibe um diagrama de solubilidade de fases do tipo A_L para os sistemas binários resultantes, sugerindo a formação de complexos solúveis. Já o declive inferior a unidade, demonstrado na TABELA 1 e obtido a partir do diagrama de solubilidade de fases, assume estequiometria 1:1 entre BNZ e α CD, β CD e γ CD (VEIGA *et al.*, 2006; BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Os valores de solubilidade intrínseca (S_0), constante de estabilidade (K_C) e coeficiente de correlação de Pearson, obtidos a partir da regressão linear do segmento ascendente do diagrama de solubilidade de fases são mostrados na TABELA 1.

TABELA 1. Peso molecular das ciclodextrinas (PM), solubilidade do BNZ (S_0), declive, constante de estabilidade (K_C), coeficiente de correlação (R^2), eficiência de complexação (EC) e razão molar, obtidos a partir do diagrama de solubilidade de fases.

	PM (g/mol)	S_0 (mM)	Declive	K_C (M^{-1})	R^2	EC	Razão Molar
α CD	972	0,768	0,0208	27,66	0,8221	0,021	1:49
β CD	1135	0,768	0,0354	47,79	0,9925	0,037	1:28
γ CD	1297	0,768	0,0161	21,31	0,8042	0,016	1:64

Maior valor de K_C foi obtido para o sistema binário BNZ: β CD, indicando que a interação do fármaco com a cavidade hidrofóbica da β CD é mais intensa se comparada à α CD e γ CD. Por exemplo, mais pontes de hidrogênio se estabeleceram entre BNZ e β CD que em α CD e γ CD. O maior valor de K_C sugere mais forte a complexação entre o fármaco e a CD (WEN *et al.*, 2005).

A β CD é amplamente utilizada para complexação com várias classes de fármacos, pois a dimensão de sua cavidade é adequada para a maioria dos

fármacos com pesos moleculares entre 200 e 800 g/mol, tal como o BNZ (PM = 260,25 g/mol), sendo possível complexar compostos aromáticos e heterocíclicos (ZINGONE & RUBESSA, 2005). Além disso, o seu uso pode ser devido ao custo, ao elevado rendimento e a qualidade na obtenção industrial desta CD.

A α CD apresenta uma unidade de glicose em posição distorcida, fazendo com que somente quatro das suas seis ligações de hidrogênio possam ser estabelecidas. Devido ao diâmetro interno de sua cavidade (4,7 – 5,3 Å) é capaz de complexar moléculas de baixo peso molecular ou composto com cadeias laterais alifáticas (DEL VALLE, 2004; WEN *et al.*, 2005). Já a γ CD, por ser uma molécula não-coplanar, de estrutura mais flexível, é a mais solúvel das três CDs naturais, podendo acomodar em sua cavidade, moléculas maiores, tais como macrocíclicos e esteróides (DEL VALLE, 2004; VEIGA *et al.*, 2006).

Estudos evidenciaram que as três CDs naturais (α CD, β CD e γ CD) apresentam-se, em solução, como agregados e estão veiculados a uma rede de ligações de hidrogênio. Assim, o valor de K_C obtido a partir do diagrama de solubilidade de fases representa uma constante de estabilidade aparente (LOFTSSON *et al.*, 2007).

A K_C é utilizada para avaliar a afinidade do fármaco à CD e determinada a partir do declive e da solubilidade intrínseca do fármaco (S_O), conforme Higuchi e Connors (1965). Teoricamente, o intercepto (S_{int}) do diagrama de solubilidade fases deveria ser igual à S_O , mas para fármacos pouco solúveis em água (< 0,1 mM), em geral, S_O é maior que S_{int} , ocorrendo maiores variações nos valores de K_C . Então, Loftsson e colaboradores (2007) propuseram o cálculo de EC, obtido do declive do diagrama de solubilidade de fases e independente de S_O e S_{int} .

A maior EC e razão molar do sistema BNZ: β CD em relação aos demais (BNZ: α CD e BNZ: γ CD) – TABELA 1 - demonstra, novamente, a maior interação entre o fármaco e a β CD e consequentemente maior eficiência de solubilização desta CD.

A TABELA 2 apresenta os resultados dos estudos de solubilidade dos sistemas binários formados entre BNZ e α CD, β CD e γ CD, demonstrando aumento na solubilidade aquosa do benznidazol. De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), para fármacos considerados de baixa solubilidade, o principal fator limitante da absorção oral é a dissolução. Essa limitação pode estar relacionada com o equilíbrio, ou seja, significa que não há líquido suficiente para dissolver a dose do medicamento. Isso pode ser verificado através do cálculo de relação dose x solubilidade (D/S), conforme proposto por Dressman e Lennernäs (2000).

A razão D/S permite prever a dissolução do fármaco no trato gastrointestinal e sua biodisponibilidade. Fármacos cuja razão D/S é maior que 250 mL são considerados pouco solúveis ao trato gastrointestinal e, portanto, com biodisponibilidade comprometida. Sabendo-se que a dose de BNZ é de 100 mg, calculou-se essa razão (TABELA 2).

TABELA 2 Relação Dose/Solubilidade do benznidazol e complexos secos em estufa e preparados por co-evaporação e liofilização. Os valores entre parênteses indicam os respectivos desvios-padrão.

	SOLUBILIDADE (mg/mL)	D/S (mL)
BNZ	0,20 ($\pm$ 0,001)	500,00
Complexo BNZ e α CD	0,29 ($\pm$ 0,007)	344,83
Complexo BNZ e γ CD	0,23 ($\pm$ 0,021)	434,78
Complexo BNZ e β CD	0,50 ($\pm$ 0,016)	200,00
Complexo BNZ e β CD (co-evaporação)	0,80 ($\pm$ 0,004)	125,00
Complexo BNZ e β CD (liofilização)	0,84 ($\pm$ 0,015)	119,05

A solubilidade aquosa do BNZ apresentou importante aumento quando complexado à β CD em consequência de D/S ter sido inferior a 250,0 mL. Assim, o fármaco inicialmente considerado de baixa solubilidade adquiriu solubilidade adequada e suficiente para a dissolução da dose (100 mg) no volume

mencionado. No entanto, isso não foi verificado nos sistemas BNZ: α CD e BNZ: γ CD.

Os sistemas preparados por liofilização e co-evaporação mostraram-se mais solúveis quando comparados ao sistema binário obtido por secagem em estufa. O emprego do solvente no sistema BNZ: β CD obtido por co-evaporação provavelmente colaborou para a dissolução do fármaco na formação do complexo, solubilizando maior número de moléculas e tornando-as disponíveis para complexação. Por outro lado, de acordo com Ribeiro e colaboradores (2003), a liofilização pode conduzir a formação de materiais porosos e/ou formação de complexos de inclusão com melhor solubilidade e dissolução. Tal fato pode ter favorecido a maior solubilização dos complexos obtidos por este processo.

FIGURA 2. Curvas DSC dos complexos de inclusão secos em estufa contendo benznidazol (BNZ) e α CD, β CD e γ CD, obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ na faixa de 30 a 240°C.

As curvas DSC dos sistemas binários BNZ:CD (α CD, β CD e γ CD), apresentadas na FIGURA 2, mostraram que a redução do evento endotérmico de fusão foi mais pronunciado no sistema constituído pela γ CD, embora este comportamento calorimétrico também tenha sido observado nos complexos α CD e β CD. A redução do evento característico do fármaco nos complexos pode estar relacionada à redução da cristalinidade, podendo assumir a formação de uma nova fase sólida devido à formação do complexo de inclusão, no qual o fármaco está pelo menos parcialmente dentro da cavidade da CD (RIBEIRO *et al.*, 2003). Além disso, em geral, em um processo de complexação nem todas as moléculas de CDs formam complexos e o material obtido é constituído por uma mistura de complexo fármaco:CD, moléculas do fármaco e CDs livres (LOFTSSON *et al.*, 2004; VILLAYERDE *et al.*, 2005).

FIGURA 3. Curvas DSC e $T_{m\text{áx}}$ dos complexos de inclusão secos em estufa, preparados por co-evaporação e liofilização contendo benznidazol (BNZ) e β CD, obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ na faixa de 30 a 240°C .

A FIGURA 3 apresenta as curvas de DSC obtidas pelos complexos BNZ:βCD, preparados por secagem em estufa, co-evaporação e liofilização. A análise calorimétrica apresentou redução do evento endotérmico característico do fármaco. Além disso, os eventos foram deslocados para temperaturas mais elevadas, indicando possivelmente a complexação dos componentes e a formação de complexos mais estáveis. Destacou-se o método de co-evaporação, que apresentou deslocamento mais pronunciado e redução mais intensa do evento endotérmico.

A análise termogravimétrica permitiu determinar as perdas de massa que se produziram no fármaco, CD e complexos de inclusão, quando submetidos ao aquecimento, como demonstrado na FIGURA 4. Na análise termogravimétrica (TGA) do BNZ, houve perda de massa de 42,14% em 249,47°C (T_{onset}).

Um indicativo da formação de complexo entre fármaco e CD é o deslocamento do evento de decomposição térmica do fármaco para temperatura mais elevada (NOVÁK *et al.*, 2006). Além da diminuição de perda de massa do fármaco no complexo, indicando a formação de uma estrutura complexada mais estável que o fármaco (AMMAR *et al.*, 2006).

FIGURA 4. Curvas TGA obtidas na faixa de 30 a 600°C para BNZ, αCD, βCD e γCD e seus respectivos complexos binários, preparados por secagem em estufa.

A TGA dos complexos binários, obtidos pelo fármaco e as CDs (α CD, β CD e γ CD) demonstrou a redução da perda de massa quando os complexos foram submetidos ao aquecimento e deslocamento de termodecomposição para temperaturas superiores a de decomposição térmica do fármaco. Essas características podem ingerir à possível formação de complexos, na qual o encapsulamento total e/ou parcial do fármaco na cavidade da ciclodextrina torna-o mais estável.

FIGURA 5. Curvas TGA obtidas na faixa de 30 a 600°C para BNZ, mistura física e complexos binários BNZ: β CD obtidos por secagem em estufa, co-evaporação e liofilização.

A avaliação das curvas TGA dos complexos preparados pelos métodos em estudo, estão apresentados na FIGURA 5. Nos diferentes métodos de preparo dos complexos BNZ:βCD, houve redução da perda de massa e elevação da temperatura de termodecomposição do fármaco de 42,14% a 249,47°C para 11,47% a 273,02°C e 11,28% a 260,93°C na secagem em estufa e liofilização, respectivamente. No caso da co-evaporação detectou-se somente o deslocamento para temperatura de 266,19°C, indicando a possibilidade da formação de complexos mais estáveis que o fármaco. O método de liofilização obteve maior redução de massa e aliado à elevação da temperatura de termodecomposição, sugere a constituição de um complexo mais estável entre BNZ e βCD e de melhor solubilidade que os demais métodos utilizados nesse estudo.

Quando ocorre complexação, as moléculas de água presentes dentro da cavidade da CD em solução são expulsas e substituídas pela molécula do fármaco ou parte dele. Nos complexos de BNZ:βCD preparados por secagem em estufa, co-evaporação e liofilização ocorreu uma diminuição do conteúdo de água no complexo, resultado da ocupação do BNZ de algumas moléculas de água associadas à estrutura da CD. No caso da co-evaporação essa perda de água foi mais pronunciada com 1,037%, enquanto a mistura física 11,22%.

Portanto, a diminuição do conteúdo de água nos complexos pode ser consequência da ocupação do BNZ na posição em que estavam as moléculas de água associadas à CD, indicando possivelmente a formação dos complexos de inclusão (AMMAR *et al.*, 2006).

4. Conclusão

Os sistemas binários de inclusão obtidos entre benznidazol e ciclodextrinas (αCD, βCD e γCD) foram capazes de aumentar a solubilidade do fármaco, sendo que a βCD apresentou maior interação com BNZ e,

consequentemente, o sistema BNZ:βCD foi mais efetivo no aumento da solubilidade do fármaco.

Os resultados obtidos nos ensaios de solubilidade, DSC e TGA sugerem que complexos BNZ:βCD podem ser preparados na proporção estequiométrica 1:1 pelos métodos de secagem em estufa, co-evaporação e liofilização, sendo que o método de liofilização apresentou-se mais eficiente na solubilidade do fármaco em relação aos demais métodos avaliados neste estudo.

Referências bibliográficas

AMMAR, H.O.; SALAMA, H.A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A.A. Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 309, p. 129-138, 2006.

BIBBY, D.C.; DAVIES, N.M.; TUCKER, I.G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. v.197, p. 1-11, 2000.

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

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. v. 123, p. 78-99, 2007.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrin and their uses: a review. *Process Biochemistry*. v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DRESSMAN, J.B.; LENNERNAS, H. Oral Drug Absorption - Prediction and Assessment , New York: Ed. Marcel Dekker, 2000; p. 161.

HIGUCHI, T.; CONNORS, A.K. Phase-solubility techniques. *Advances Analytical Chemistry Instrumental*. v. 4, p. 117-212, 1965.

LOFTSSON T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. v. 57, p. 545-552, 2007.

MARTINDALE. 35 Ed. Pharmaceutical Press, 2007. p. 747.

MORILLA, M.J.; BENAVIDEZ, P.; LOPEZ, M.O.; BAKAS, L.; ROMERO, E.L. Development and in vitro characterisation of a benzimidazole liposomal formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 249, p. 89-99, 2002.

NOVÁK, C.; ÉHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSZKY, ORGOVÁNYI, J. Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v. 84, p. 693-701. 2006.

RIBEIRO, L.S.S.; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vipocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 20. p. 253-266, 2003.

SMITH, J.S.; MACRAE, R.J.; SNOWDEN, M.J. Effect of SBE7- β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from sustained release beads. *European Journal of Pharmaceutics Science*. v. 60, p. 73-80, 2005.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As Ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica. Coimbra: Ed. MinervaCoimbra, 2006.

VILLAVERDE, J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J.I.; MAQUEDA, C.; GINÉS, J.M.; MORILLO. Inclusion complexes of α - and γ -cyclodextrins and the herbicide

norflurazon: I. Preparation and characterization. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. *Chemosphere*. v. 60, p. 656-664, 2005.

ZHANG, X.; ZOU, M.; LI, S.; CHEN, X.; ZHONG, D. Bioavailability of clarithromycin cyclodextrin ternary complexes upon oral administration to healthy beagle dogs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. p. 1-6, 2008.

ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 291, p. 3-10, 2005.

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between α , β -cyclodextrins and simvastatin. *Chemical Physics Letters*. v. 405, p. 114-117, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. TDR Strategic Direction: Chagas disease. WHO. Geneva, 2006. Disponível em: http://www.who.int/tdr/publication/publication/pdf/swg_chagas.pdf.

Capítulo 4

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS TERNÁRIOS CONTENDO BENZNIDAZOL, CICLODEXTRINAS E POLÍMEROS HIDROSSOLÚVEIS

RESUMO

O objetivo desse estudo foi aumentar a solubilidade do BNZ, através da formação de complexos ternários com as ciclodextrinas β CD e HP β CD e adição dos polímeros hidrossolúveis povidona e copovidona. Os complexos ternários foram preparados na proporção estequiometria 1:1 entre fármaco e CD e adição de 1,0% de polímero hidrossolúvel, preparados pelos métodos de secagem em estufa, co-evaporação e liofilização e caracterizados pelos ensaios de solubilidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA). A β CD mostrou-se mais eficiente que a HP β CD, pois apresentou maior constante de estabilidade, eficiência de complexação e consequentemente solubilidade. Para os complexos ternários propostos nesse estudo, o polímero copovidona foi mais efetivo no aumento de solubilidade que a povidona. Dessa forma, o complexo ternário que apresentou melhor eficiência na solubilidade do fármaco foi o BNZ: β CD:copovidona que pôde ser potencializada quando preparado por liofilização.

Palavras-chave: Benznidazol, Ciclodextrina, Complexos ternários, Polímero, Solubilidade.

1. Introdução

As ciclodextrinas (CDs) apresentam a capacidade de formar complexos de inclusão solúveis em água com muitos compostos lipofílicos, uma vez que sua cavidade central promove um microambiente lipofílico com adequado tamanho para que moléculas, inclusive de fármacos, possam ser incluídas (DEL VALLE, 2004; CARRIER *et al.*, 2007).

A β CD é a ciclodextrina natural com maior aplicação no campo farmacêutico, pois é obtida industrialmente com elevado rendimento e qualidade, apresenta custos reduzidos, além de possuir uma cavidade interna cujas dimensões são excelentes para incorporar compostos heterocíclicos. Entretanto, devido a baixa solubilidade aquosa da β CD (18,5 mg/mL) pode-se propor o uso de agentes complexantes mais solúveis, como por exemplo a hidroxipropil- β CD (HP β CD) com solubilidade aquosa maior que 600 mg/mL (VEIGA *et al.*, 1996; JAMBHEKAR *et al.*, 2004).

Quando possível, a concentração de CDs nas formulações deve ser otimizada devido ao volume que as formas farmacêuticas sólidas podem atingir. Um dos métodos para alterar a eficiência de complexação é a adição de polímeros hidrossolúveis ao meio de complexação, o que pode contribuir para a redução da quantidade de CD necessária para alcançar a solubilidade desejada do fármaco (CIRRI *et al.*, 2006; BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Nota-se um efeito positivo da adição de pequenas quantidades de polímeros hidrossolúveis no sistema fármaco - CD, por aumentar a complexação de ambos e a eficiência de solubilização da CD, com menores quantidades das mesmas (LOFTSSON & FRIDRIKSDÓTTIR, 1998; MURA, *et al.*, 2001). Sabe-se que os complexos ternários fármaco-CD-polímero hidrossolúvel possuem propriedades físico-químicas diferentes das dos correspondentes sistemas fármaco-CD (MURA, *et al.*, 2001). No entanto, a estrutura química precisa dos

complexos formados por fármaco:CD:polímero não está elucidada (VALERO *et al.*, 2003).

Por outro lado, o benznidazol (BNZ) é o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento da Tripossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas. Apresenta baixa solubilidade o que pode comprometer a sua biodisponibilidade (LAMAS *et al.*, 2006, CARRIER *et al.*, 2007).

Considerando-se, então, a grande importância do BNZ na terapêutica da doença de Chagas e sua limitada solubilidade, a complexação com CDs em sistemas ternários poderia ser uma alternativa para melhorar a solubilidade aquosa do fármaco e, conseqüentemente, de sua biodisponibilidade.

Assim, o objetivo desse trabalho foi obter e caracterizar os sistemas fármaco:CDs (β CD e HP- β CD):polímeros hidrossolúveis (povidona e copovidona), utilizando técnicas de secagem em estufa, co-evaporação e liofilização com a finalidade de melhorar a solubilidade do fármaco.

2. Material e Métodos

2.1 Materiais

Foi utilizado BNZ gentilmente cedido por Roche Farmacêutica (Brasil) com grau de pureza de 99,33%. As ciclodextrinas empregadas nesse estudo foram β -ciclodextrina (Cawamax W7) (ISP - International Specialty Products, Brasil) e HP- β ciclodextrina (HP β CD) (Chemunion Química Ltda, Brasil). Os polímeros utilizados foram povidona (PVP K-30) e copovidona (Kollidon VA64), BASF.

2.2 Preparação dos sistemas ternários

Os complexos ternários foram preparados na proporção estequiométrica 1:1 entre fármaco e CD (β CD e HP- β CD) e adição de 1,0% de polímero hidrossolúvel (povidona e copovidona). A secagem do material foi realizada por secagem em estufa. Outros dois métodos: co-evaporação e liofilização foram empregados para comparação e escolha do mais adequado.

2.2.1 Secagem em estufa

Quantidades equimolares de BNZ e CD (β CD e HP- β CD) foram dispersas, separadamente, em água purificada e adicionados de 1,0% (p/p) de polímero hidrossolúvel (povidona e copovidona). A dispersão resultante foi submetida à agitação magnética em agitador Speedlab Nalgon (Brasil) por 48 horas a temperatura ambiente. A secagem do material foi realizada em estufa com circulação forçada de ar Fabbe-Primar (Brasil) à 45°C por 48 horas.

2.2.2 Método de co-evaporação

O sistema ternário foi preparado na proporção estequiométrica (1:1) entre BNZ e β CD, dispersos, separadamente, em metanol e em água purificada, respectivamente. A esse sistema foram adicionados 1,0% de copovidona (p/p). As dispersões permaneceram sob agitação magnética em agitador Speedlab Nalgon (Brasil) por 48 horas a temperatura ambiente e a eliminação do solvente em rotaevaporador Tecnal, TE 210 (Brasil) à 50°C por 2 horas e em seguida o material foi levado à estufa com circulação forçada de ar Fabbe-Primar (Brasil) à 40°C por 48 horas para secagem total.

2.2.3 Liofilização

Para obtenção dos complexos por este processo, uma quantidade separadamente, e em seguida, reunidos em um mesmo recipiente quando foi adicionada copovidona correspondente a 1,0% (p/p). O material permaneceu sob agitação magnética em agitador Speedlab Nalgon (Brasil) por 48 horas a temperatura ambiente para que houvesse interação entre os componentes. Na seqüência, a mistura foi congelada por imersão em banho de etanol e liofilizada em liofilizador Savant Modulyo à -40°C por 48 horas.

2.3 Caracterização dos complexos ternários

2.3.1 Solubilidade dos complexos

O ensaio de solubilidade de fases foi realizado como descrito por Higuchi & Connors (1965). Uma quantidade em excesso de fármaco foi adicionada a iguais volumes de soluções de CD (β CD e HP β CD) de concentração crescente (5, 10, 15 e 20 mM) na presença de 1,0% de copovidona.

As suspensões obtidas foram submetidas à agitação de 200 rpm por 72 horas à temperatura de 37°C em incubadora orbital Tecnal, TE 420 (Brasil). Em seguida, as amostras foram filtradas, apropriadamente diluídas e analisadas por espectrofotometria na região ultravioleta em espectrofotômetro Beckman Coulter, DU 640 (EUA) utilizando o comprimento de onda de 324 nm. As medidas foram feitas em duplicata.

A constante de estabilidade dos complexos (K_C) foi calculada de acordo com Higuchi & Connors (1965) a partir da fração linear do diagrama de solubilidade, segundo a equação:

$$K_C = \frac{\text{declive}}{S_0 \times (1 - \text{declive})}$$

Onde K_C é a constante de estabilidade e S_0 é a solubilidade intrínseca do fármaco.

Segundo Loftsson e colaboradores (2007), foi calculada a Eficiência de Complexação (CE), obtida a partir do declive de seu diagrama de solubilidade de fases, conforme abaixo:

$$CE = S_0 \cdot K_C = \frac{[F/CD]}{[CD]} = \frac{\text{Declive}}{(1 - \text{Declive})}$$

Onde $[F/CD]$ é a concentração do complexo dissolvido, $[CD]$ é a concentração de ciclodextrina livre dissolvida e Declive representa a inclinação da reta obtida do diagrama de solubilidade de fases.

Além disso, a CE pode ser usada para calcular a razão molar F:CD (LOFTSSON *et al*, 2007).

$$F : CD = 1 : \left(1 + \frac{1}{CE} \right)$$

A determinação da solubilidade do fármaco em um complexo de inclusão seguiu a metodologia de equilíbrio, já descrita no item 2.3.

A partir da razão dose x solubilidade (D/S) obteve-se o volume de solução requerida (em mL) para a completa dissolução do fármaco (DRESSMAN & LENNERNAS, 2000).

$$D/S = \frac{\text{dose (mg)}}{\text{Solubilidade aquosa (mg/mL)}}$$

2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises térmicas foram efetuadas usando equipamento TA Instruments, DSC 2920 (EUA) para as amostras de BNZ e complexos ternários obtidos, empregando razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, na faixa de 30 a 240°C , em atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$) e células de alumínio seladas, com massa entre 2 e 3 mg.

2.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Foram pesadas de 8 a 15 mg das amostras de complexos ternários e fármaco em cadinho de platina e analisados em equipamento TA Instruments, TGA 2950 (EUA) sob atmosfera inerte de N_2 com fluxo de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ na faixa de 30 a 600°C .

3. Resultados e discussão

Em todos os processos de complexação, incluindo aqueles associados à CDs, é extremamente importante o conhecimento e a determinação da

constante de estabilidade (BREWSTER & LOFTSSON, 2007). A solubilidade de fases representa um método tradicional na determinação da constante de estabilidade da interação fármaco:ciclodextrina:polímero, baseando-se na alteração da solubilidade do fármaco em relação à concentração de CD. Por meio desse método é possível, ainda, determinar a estequiometria de equilíbrio (VEIGA *et al.*, 2006; BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

A FIGURA 1 representa o diagrama de solubilidade de fases que se estabeleceu durante a formação dos complexos ternários BNZ: β CD:copovidona e BNZ:HP β CD:copovidona. As curvas apresentaram aumento linear da solubilidade do BNZ em função do aumento da concentração de CD e, portanto, exibem diagrama de solubilidade de fases do tipo A_L para o sistema ternário. Esse tipo de diagrama representa a formação de complexos solúveis.

FIGURA 1. Diagrama de solubilidade de fases dos sistemas ternários - BNZ:βCD:copovidona e BNZ:HPβCD:copovidona.

A TABELA 1 demonstra os resultados obtidos a partir do diagrama de solubilidade de fases.

TABELA 1. Solubilidade (S_0) do BNZ, declive, constante de estabilidade (K_c), coeficiente de correlação (R^2), eficiência de complexação (EC) e a razão molar obtidos a partir do diagrama de solubilidade de fases para os sistemas ternários

	S_0 (mM)	Declive	K_c (M^{-1})	R^2	EC	Razão molar
BNZ: β CD:copovidona	0,768	0,0530	72,90	0,9771	0,053	1:19
BNZ:HP β CD:copovidona	0,768	0,0407	55,25	0,9324	0,042	1:24

O valor de K_c é usado também para comparar a afinidade do fármaco a diferentes CDs ou derivados de CDs. Os valores de K_c , nesse estudo, sugerem que a β CD formou complexo de inclusão mais estável com o BNZ quando comparado à HP β CD. Esses resultados podem refletir um obstáculo estérico dos grupos hidroxipropil da HP β CD que dificultaria a inclusão do fármaco na cavidade dessa CD (LOFTSSON & FRIDRIKSDÓTTIR, 1998; FERNANDES *et al.*, 2002).

Alguns estudos consideram que a determinação da CE seria o método mais preciso para avaliar o efeito solubilizante da CD, pois tanto esta quanto os complexos de inclusão formam agregados e tais agregados são capazes de solubilizar o fármaco através de mecanismos do tipo micelar. Além disso, os polímeros também podem participar na formação do complexo. Assim, a constante de estabilidade aparente, determinada a partir da solubilidade de fases, descreve o efeito combinado de várias estruturas na solubilidade do fármaco (LOFTSSON *et al.*, 2007).

A K_c foi determinada a partir do declive e da solubilidade do fármaco em solução aquosa (S_0). Teoricamente o intercepto (S_{int}) do diagrama de solubilidade de fases deveria ser igual à S_0 . Para fármacos pouco solúveis, como o BNZ,

geralmente S_0 é maior que S_{int} e isso pode conduzir a erros no cálculo de K_C . Sugeriu-se que CE seria um método mais preciso na determinação da eficiência de complexação das CDs, sendo esta calculada a partir do declive do diagrama de solubilidade de fases e independe dos valores de S_0 e S_{int} .

Os valores de CE e a razão molar dos complexos ternários obtidos nesse estudo demonstraram que o uso do polímero hidrossolúvel copovidona teve efeito mais pronunciado quando se utilizou a β CD em relação à $HP\beta$ CD. Do mesmo modo, os resultados de solubilidade dos complexos (FIGURA 2) constituídos pela $HP\beta$ CD foram inferiores à β CD.

FIGURA 2. Solubilidade do BNZ e sistemas ternários (BNZ: β CD:povidona/copovidona e BNZ: $HP\beta$ CD:povidona/copovidona) obtidos por secagem em estufa.

Na FIGURA 2 também se observa que os complexos ternários preparados com copovidona foram mais solúveis que os complexos preparados com povidona. A melhor solubilidade dos complexos que utilizaram copovidona em relação à povidona, possivelmente é explicada considerando que nem toda a molécula do fármaco é incluída dentro da cavidade da CD, uma fração da molécula fica exposta e a copovidona, provavelmente, apresentou maior afinidade pela superfície exposta que a povidona, sendo mais eficaz na solubilização do complexo ternário (WEN *et al.*, 2005).

Para avaliar o efeito do método de preparo sobre a formação dos complexos foram desenvolvidos sistemas ternários BNZ:βCD:copovidona empregando as técnicas de liofilização e co-evaporação. A razão D/S foi calculada para os complexos obtidos e os resultados apresentados na TABELA 2.

TABELA 2. Relação Dose/Solubilidade do benznidazol e complexos ternários obtidos por secagem em estufa, co-evaporação e liofilização. Os valores entre parênteses indicam os respectivos desvios-padrão.

	SOLUBILIDADE (mg/mL)	D/S (mL)
BNZ	0,20 (± 0,001)	500,0
BNZ: βCD:povidona	0,47 (± 0,022)	212,8
BNZ: βCD:copovidona	0,54 (± 0,014)	185,2
BNZ:HPβCD:povidona	0,40 (± 0,009)	250,0
BNZ:HPβCD:copovidona	0,46 (± 0,011)	217,4
BNZ: βCD:copovidona - co-evaporação	0,81 (± 0,035)	123,5
BNZ: βCD:copovidona - liofilização	0,86 (± 0,021)	116,3

A solubilidade aquosa do BNZ aumentou quando complexado à β CD e HP β CD na presença de polímeros, atingindo volume de meio inferior a 250 mL para todos os complexos de inclusão formados. De acordo com a classificação biofarmacêutica, um fármaco adquire solubilidade adequada quando a relação D/S é menor ou igual a 250 mL (DRESSMAN & LENNERNÄS, 2000; YU, *et al.*, 2004). Assim, o fármaco, inicialmente considerado de baixa solubilidade, quando complexado adquiriu solubilidade adequada para a dissolução da dose no trato gastrointestinal.

O aumento de solubilidade foi mais pronunciado nos complexos preparados pelos métodos de liofilização e co-evaporação. Tais métodos podem auxiliar na formação de complexos de inclusão e/ ou redução da cristalinidade dos compostos, dando origem a sistemas com cinética de dissolução mais rápida (CARRIER *et al.*, 2007).

As curvas DSC dos sistemas ternários BNZ:HP β CD:povidona e BNZ:HP β CD:copovidona estão representadas na FIGURA 3.

FIGURA 3. Curvas DSC dos complexos de inclusão BNZ:HP β CD:polímeros, preparados por secagem em estufa, obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

A redução dos eventos do BNZ nos sistemas ternários compostos pelo fármaco:HP β CD:povidona ou copovidona (FIGURA 3) obtidos por secagem em estufa, pode estar relacionada à formação de uma estrutura com características mais amorfas e/ou formação de complexos de inclusão (RIBEIRO, *et al.*, 2003). Em um processo de complexação nem todas as moléculas de CDs formam complexos, e o material obtido é constituído por uma mistura de complexo fármaco:CD, moléculas do fármaco e CDs livres (LOFTSSON *et al.*, 2004; VILLAVARDE *et al.*, 2005).

FIGURA 4. Curvas DSC dos complexos de inclusão contendo BNZ, β CD e polímeros preparados por secagem em estufa, co-evaporação e liofilização, obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

Os eventos endotérmicos apresentados até a temperatura de 130°C são conseqüências da perda de água. As formas complexadas mostraram nas curvas DSC redução do evento endotérmico característico do BNZ para os complexos

preparados por secagem em estufa, co-evaporação e liofilização, provavelmente indicando que nem todo o fármaco presente foi capaz de ser incluso na cavidade da β CD (RIBEIRO, *et al.*, 2003).

FIGURA 5. Curvas termoanalíticas de TGA obtidas na faixa de 30 a 600°C das amostras de BNZ, β CD e complexos ternários (BNZ: β CD:copovidona) por secagem em estufa, co-evaporação e liofilização.

A análise termogravimétrica permitiu determinar as perdas de massa quando as amostras foram submetidas ao aquecimento, como demonstrado na FIGURA 5.

A formação de complexo entre fármaco e CD pode ser representada pelo deslocamento do evento de decomposição térmica do fármaco para temperatura mais elevada, indicando a formação de uma estrutura complexada mais estável que o fármaco (AMMAR *et al.*, 2006; NOVÁK *et al.*, 2006).

Na análise dos diferentes métodos de preparo dos complexos BNZ:βCD:copovidona, observou-se redução da perda de massa e deslocamento da temperatura de termodecomposição do fármaco de 42,16% a 249,47°C para 10,60% a 268,55°C, 9,703% a 277,33°C e 9,247% a 240,11°C na secagem em estufa, co-evaporação e liofilização, respectivamente. No complexo preparado por liofilização não ocorreu o deslocamento da termodecomposição para temperatura mais elevada, no entanto, esse complexo apresentou maior redução de perda de massa, comparado com os demais métodos empregados. Além desses fatores, Ammar e colaboradores (2006) indicam que a diminuição do conteúdo de água nos complexos pode ser consequência da ocupação do BNZ na posição em que estavam as moléculas de água associadas à CD, indicando possivelmente a formação dos complexos de inclusão. Aliado aos valores de solubilidade, a preparação do sistema ternário por liofilização foi o mais adequado para atender os objetivos propostos nesse estudo.

4. Conclusão

Os complexos ternários contendo benznidazol, ciclodextrinas (βCD e HPβCD) e polímeros hidrossolúveis (povidona e copovidona) foram capazes de aumentar a solubilidade do fármaco. A βCD foi mais eficiente na solubilização do

fármaco que a HP β CD e o complexo que utilizou a copovidona apresentou melhor solubilidade que a povidona para os sistemas ternários propostos nesse estudo.

Comparando-se os métodos de preparo dos complexos, obtiveram-se melhores resultados para o sistema preparado por liofilização. Assim, o complexo ternário que apresentou melhor eficiência na solubilização do fármaco foi o BNZ: β CD:copovidona, preparado pelo método de liofilização.

Referências bibliográficas

AMMAR, H.O.; SALAMA, H.A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Implication of inclusion complexation of glimepiride in cyclodextrin-polymer systems on its dissolution, stability and therapeutic efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 320, p. 53-57, 2006.

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

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. v. 123, p. 78-99, 2007.

DRESSMAN, J.B.; LENNERNAS, H. Oral drug absorption - prediction and assessment, New York: Ed. Marcel Dekker, 2000; p. 161.

CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; CORTI, G.; FURLANETTO, S.; MURA, P. Simultaneous effect of cyclodextrin complexation, pH, and hydrophilic polymers on naproxen solubilization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 42, p. 126-131, 2006.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrin and their uses: a review. *Process Biochemistry*. v. 39, p. 1033-1046, 2004.

FERNANDES, C.M.; VIEIRA, M.T.; VEIGA, F.J.B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 15, p. 79-88, 2002.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. *Advances Analytical Chemistry Instrumental*. v. 4, p. 117-212, 1965.

JAMBHEKAR, S.; CASELLA, R.; MAHER, T. The physicochemical characteristics and bioavailability of indometacin from β -cyclodextrin, hydroxyethyl- β -cyclodextrin, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 270, p. 149-166, 2004.

LAMAS, M.C.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMÓN, C. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*. V. 307, p. 239-243, 2006.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena Macrocycl Chemistry*. v. 57, p. 545-552, 2007.

LOFTSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 163, p. 115-121, 1998.

LOFTSSON, T.; SIGURDSSON, H.H.; MÁSSON, M.; SCHIPPER, N. Preparation of solid drug/cyclodextrin complexes of acidic and basic drugs. *Pharmazie*. v. 59, p. 25-29, 2004.

NOVÁK, C.; ÉHEN, Z.; FODOR, M.; JICSINSZKY, ORGOVÁNYI, J. Application of combined thermoanalytical techniques in the investigation of cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v. 84, p. 693-701. 2006.

MURA, P.; FAUCCI, M.T.; BETTINETTI, G.P. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 13, p. 187-194, 2001.

RIBEIRO, L.S.S.; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vipocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 20. p. 253-266, 2003.

VALERO, M.; CARRILLO, C.; RODRÍGUEZ, L.J. Ternary naproxen: β -cyclodextrin:polyethylene glycol complex formation. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 265, p. 141-149, 2003.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. *As Ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica*. Coimbra: Ed. MinervaCoimbra, 2006.

VILLAVARDE, J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J.I.; MAQUEDA, C.; GINÉS, J.M.; MORILLO. Inclusion complexes of α - and γ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterization. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. *Chemosphere*. v. 60, p. 656-664, 2005.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v.270, p. 221-227, 2004.

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between α , β -cyclodextrins and simvastatin. *Chemical Physics Letters*. v. 405, p. 114-117, 2005.