

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Josimar de Oliveira Eloy

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Josimar de Oliveira Eloy
Orientadora: Juliana Maldonado Marchetti

Ribeirão Preto

2012

RESUMO

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

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

dispersões sólidas preparadas pelo método do solvente aumentaram sua solubilidade e melhoraram seu perfil de dissolução comparado às dispersões sólidas pelo método da fusão e misturas físicas, sendo este aumento maior para os sistemas compostos por Poloxamer 407 + caprato de sódio, seguido por Poloxamer 407, Gelucire 50/13 + dióxido de silício coloidal e PEG 6000, o que pode ser atribuído ao poder tensoativo dos três primeiros carreadores. As formulações mostram-se seguras até a concentração de 128 μM do fármaco, através da avaliação da citotoxicidade. Por último, o ursólico teve um aumento significativo da atividade tripanocida para a formulação composta pelo tensoativo Poloxamer 407 junto com o promotor de absorção oral caprato de sódio, manipulada pelo método do solvente, sugerindo o aumento da biodisponibilidade do fármaco.

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

ABSTRACT

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

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

silicon dioxide and PEG 6000, which can be attributed to the surfactant property of the three first carriers. The formulations were safe up to 128 μM of the drug, showed by the cytotoxicity evaluation. Very importantly, we highlight that ursolic acid had a significant increase in the trypanocidal activity for the product prepared with the surfactant Poloxamer 407 and the penetration enhancer sodium caprate, prepared by the solvent method, suggesting that in this composition ursolic acid was more bioavailable.

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

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

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

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

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

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

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

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

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

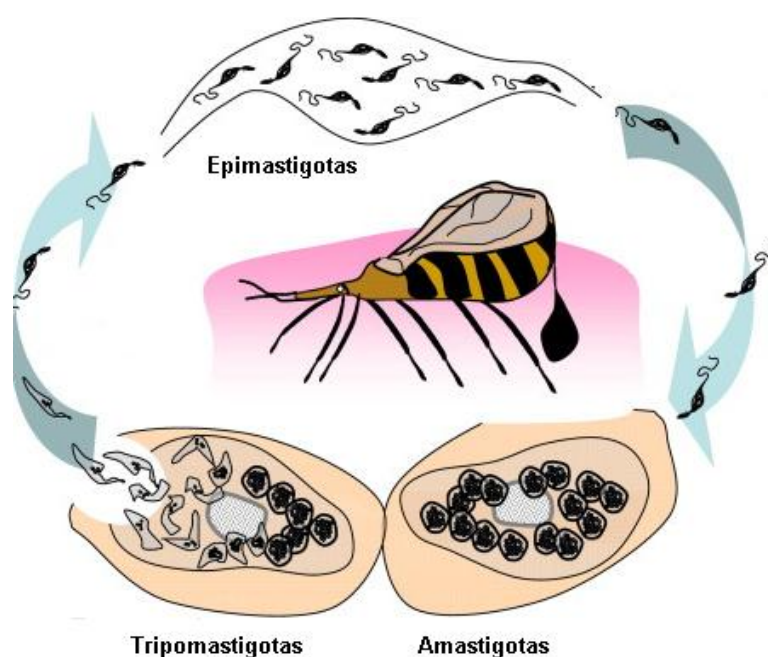


Figura 01. Transmissão da doença de Chagas inseto – hospedeiro (adaptado de ROMERO; MORILLA, 2010)

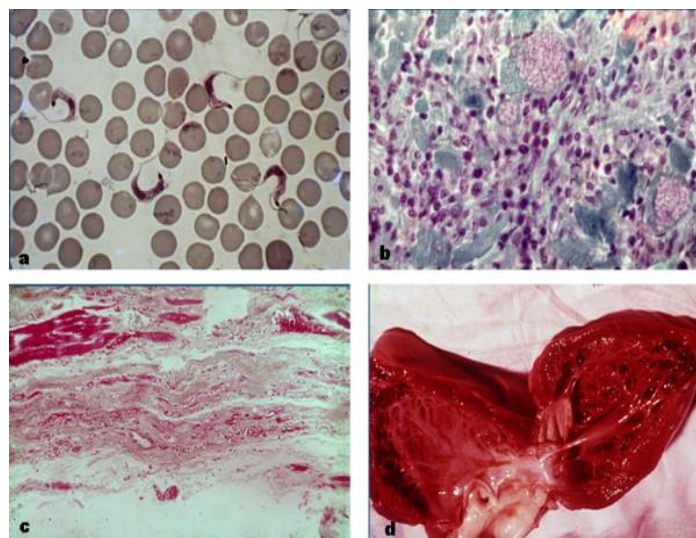


Figura 02. (a) Tripomastigotas circulantes e (b) pseudocistos de amastigotas de um caso agudo de doença de Chagas. (c) Fibrose dos sistemas condutores e (d) hipertrofia do miocárdio na fase crônica da doença de Chagas (COURA et al., 2007)

1.2 Medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Ácido ursólico

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

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

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

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

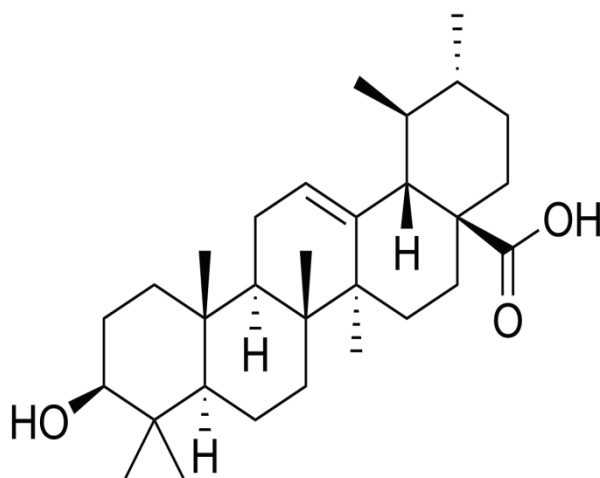


Figura 03 – Estrutura química do ácido ursólico

1.4 Administração oral e biodisponibilidade

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

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

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

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

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

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

1.5 Dispersões sólidas

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

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

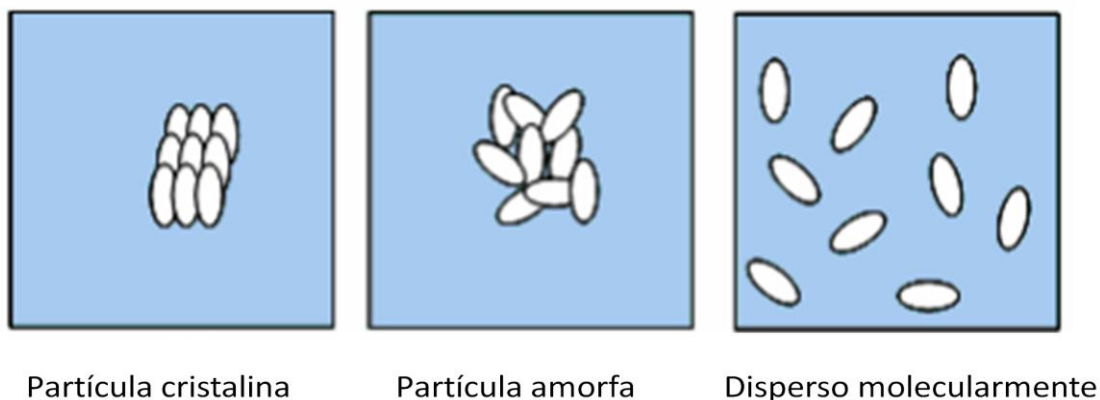


Figura 04. Representação esquemática da organização molecular de fármacos em dispersões sólidas (adaptado de DIHENDRA et al, 2009).

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

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

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

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

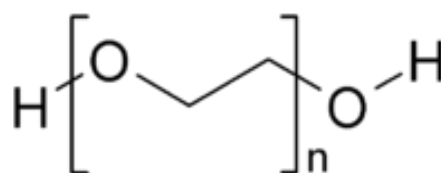


Figura 05. Estrutura química do polietilenoglicol

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

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

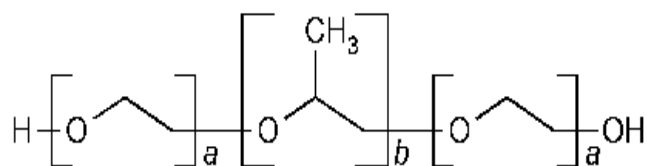


Figura 06. Estrutura química do poloxamer

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

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

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

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

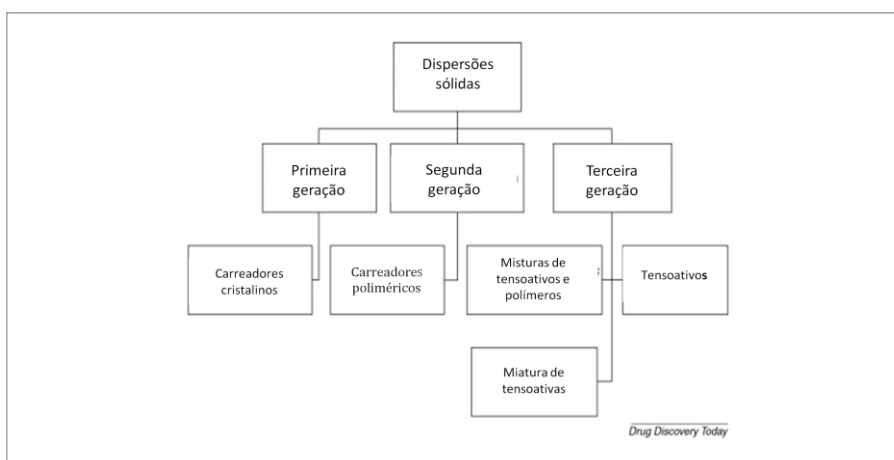


Figura 07. Fases da pesquisa em dispersões sólidas (adaptado de VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

1.6 Caracterização físico-química

1.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

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

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

1.6.2 Espectroscopia do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

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

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

1.6.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

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

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

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

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

1.6.4 Microscopia em *hot stage* (HSM)

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

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

1.6.5 Difractometria de raios-X (DRX)

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

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

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

1.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

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

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

1.7 Avaliação

1.7.1 Solubilidade

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

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

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

1.7.2 Perfil de dissolução

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

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

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

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

1.7.3 Citotoxicidade

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

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

1.7.4 Atividade tripanocida

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

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

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

2- CONCLUSÃO

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

3- REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHUTIMAWORAPAN, S. et al. Effect of water soluble carriers on dissolution characteristics of nifedipine solid dispersions. **Drug Delivery and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 1141-1150, 2000.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A Critical Review in Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 97, n.1, p. 3-24, 2002.

CRAIG, Q.M.D. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymer. **International Journal of Pharmacy**, v. 231, p. 131-134, 2002.

CRESPO, F.A. et al. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity in *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 79, p. 1062-1068, 2006.

CUNHA, W.R. et al. A study of trypanosomicidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 474-478, 2006.

DAMIAN, F. et al. Physicochemical characterization of solid dispersions of the antiviral agent UC-781 with polyethylene glycol 6000 and Gelucire 44/14. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 10, p. 311-322, 2000.

DANNENFELSER, R.M. et al. Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I: Application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, p. 1165–1175, 2004.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. **Epidemiologia**, p. 33-66, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FINI, A. et al. Diclofenac salts II. Solid dispersions in PEG6000 and Gelucire 50/13. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 99-11, 2005.

FISICHELLA, M. et al. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 697-703, 2009.

FORD, J.L. The current status of solid dispersions. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 61, p. 69-88, 1986.

FORD, J.L.; MANN, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 422-430, 2012.

FU, X. et al. Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. **Particuology**, v. 10, p. 203-208, 2012.

GARLE, M.J.; FENTEM, F.H.; FRYS, J.R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicology in vitro**, v. 8, p. 1303-1312, 1994.

GNOATTO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC Method to assay total saponins in *Ilex Paraguaiensis* aqueous extract. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v 16, p. 723-726, 2005.

GODDEERIS, C.; VAN DEN MOOTER, G. Free flowing solid dispersions of the anti-HIV drug UC 781 with Poloxamer 407 and a maximum amount of TPGS 1000: investigating the relationship between physicochemical characteristics and dissolution behavior. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 104-113, 2008.

GUEDES, P.M. et al. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, p. 609-620, 2011.

Haida K.S. et al. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 4, p. 61, 2011

Higuchi, M. et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, p. 96-107, 2003.

Higuchi, T.; Connors, K.A. Phase solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117-212, 1965.

Hill, J. For Better Thermal Analysis and Calorimetry. **International Conference of Thermal Analysis**, p. 10-11, 1991.

Hoare, C.A.; Wallace, F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385-1386, 1966.

Horiuchi, K. et al. Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnasol from *Salvia officinalis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 287-290, 2007.

Horter, D.; Dressman, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 25, p. 3-14, 2001.

Hotez, P.J. et al. The neglected tropical disease of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and roadmap for control and elimination. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 2, e300, 2008.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005

James K. Solubility and related properties, vol. 28, Marcel Dekker Inc., New York, 986, 127-146, 1986.

JANG, S.M. et al. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 113-119, 2009.

JEONG, D.H; KIM H.G; HWANG, Y.P. Involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. **Toxicology Letters**, v. 155, p. 369-376, 2005.

JONES, M.C.; LEROUX, J.C. Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmacy and Biopharmacy**, v. 48, p. 101-11, 1999.

KABANOV, K.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of the Controlled Release**, v. 82, p. 189-212, 2002.

KARATAS, A.; YUKSEL, N.; BAYKARA, T. Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. **Farmaco**, v. 60, p. 777-782, 2005.

KIM, E.J. et al. Preparation of a solid dispersion of felodipine using a solvent wetting method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 200-205, 2006.

KONTOGIANI, V. G. et al. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 188-195, 2009.

LEE, S.H. et al. Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo. **Pharmacology Research**, v. 58, p. 290-296, 2008.

LEE J. et al. Ursolic acid ameliorates thymic atrophy and hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice. **Chemical-Biological Interaction**, v. 108, p. 635-642, 2010.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 47–60, 2000.

LI, G. et al. Highly sensitive and selective pre-column derivatization high-performance liquid chromatography approach for rapid determination of triterpenes oleanolic and ursolic acids and application to Swertia species: Optimization of triterpenic acids extraction and pre-column derivatization using response surface methodology **Analytica Chimica Acta**, v. 688, p. 208-218, 2011.

LI, R. et al. The influence of cosolvent on the complexation of HP-beta-cyclodextrins with oleanolic acid and ursolic acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 40, p. 1137 - 1144, 2009

LIU, J. Oleanolic acid and Ursolic acid: Research Perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92-94, 2005.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

LOPES, L.B. et al. Advance directives for hormone administration in replacement therapy and contraception. **Current Topics in Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 335 – 351, 2003.

LOWER, E.S. Capric acid-uses and properties. **Manufacturing Chemist**, v. 55, p. 61-63, 1984.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1109-1143, 2005.

RESENDE, F.A. et al. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastrogenesis in Balb/c mice. **Life Sciences**, v. 79, p. 1268-1273, 2006.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, I. et al. New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 3, e484, 2009.

RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of To-71051 on parasitemia and tissue parasitism. **Le Progrés Médical**, v. 101, p. 282, 1973.

ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 576-588, 2010.

SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K.V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sciences**, v. 78, p. 713-718, 2006.

SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on absorption of eutectic mixtures. I. A comparison of the behavior of eutectic mixtures of sulphathiazole and that of ordinary sulphathiazole in man. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, p. 866-872, 1961.

SENEDESE, J.M. et al. Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells in vitro

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOMOVA, L.O. et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, p. 115-121, 2003.

STREUBEL, A.; JUERGEN, S.; BODMEIER, R. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 501–508, 2006.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 445–462, 2009.

TACHIBANA, T.; NAKAMURA, A. A method for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: dispersion of beta-carotene by polyvinylpyrrolidone. **Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere**, v. 203, p. 130-133, 1965.

TAKADA, K. et al. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoids acids, suppress TNF- α -induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1114-1119, 2010.

TAYLOR, L.S.; ZOGRAFI, G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 1691-1698, 1997.

TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURN, A. Evolution and pathology in Chagas disease. A Review. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 463-491, 2006.

TERPUGOV, E.L.; DEGTYAREVA, O.V. Infrared emission from photoexcited bacteriorhodopsin: studies by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 565, p. 287-292, 2001.

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

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

TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, p. 2188-2194, 2002.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific Chemotherapy for Chagas Disease: controversies and Advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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