

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS
ÁREA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS**

**Antimaláricos potenciais: Pró-fármacos poliméricos e formas de liberação
controlada de artemisinina**

HÉLIO SANTA ROSA COSTA SILVA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Elizabeth Igne Ferreira

**São Paulo
2006**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS
ÀREA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS**

**Antimaláricos potenciais: Pró-fármacos poliméricos e formas de liberação
controlada de artemisinina**

HÉLIO SANTA ROSA COSTA SILVA

Tese para obtenção grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Elizabeth Igne Ferreira

**São Paulo
2006**

Hélio Santa Rosa Costa Silva

Antimaláricos potenciais: Pró-fármacos poliméricos e formas de liberação controlada de artemisinina

Comissão julgadora

da

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

Presidente e Orientadora

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, 31 de Março de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Arnóbio e Maria da Cruz pelo amor, e dedicação à família; pela renúncia em função da educação dos filhos!! OBRIGADO POR TUDO, AMO VOCÊS!!

Aos meus irmãos Augusto, Júnior, Leonardo e Luciana: valeu pelos momentos felizes e pela paciência, algumas vezes necessárias!! VOCÊS SÃO MUITO IMPORTANTES PARA MIM.

Aos meus familiares aqui em São Paulo, pela acolhida sempre que necessária: Tia Francisca, Selma, Hélio, Edicleiton e Chico.

"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... e a vida é muito para ser insignificante"

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela sua presença constante e pelo o dom da vida, a qual procuramos vivê-la da forma mais justa e sincera.

À Professora Elizabeth Igne Ferreira minha sincera gratidão pela orientação, disponibilidade, incentivo e apoio recebido, em especial, as orientações no momento do doutorado sanduíche, que se mostraram muito importantes e imprescindíveis. Muito obrigado professora!!

À Professora Maria Helena Gil da Universidade de Coimbra pela acolhida em Portugal durante a realização de parte do doutorado sanduíche.

À Professora Tereza Neuma de Castro Dantas pela orientação desenvolvida na época da iniciação científica e no mestrado.

Ao Professor Carlos Alberto Brandt pela ajuda com os espectros de ressonância magnética nuclear e pelas sugestões durante a qualificação.

À Professora Ivone Carvalho pelas sugestões durante o exame de qualificação.

A Professora Rosângela Balaban Garcia pelas análises viscosimétricas e apoio durante as referidas análises no Laboratório de Polímeros na UFRN.

À minha grande amiga Kátia Solange a quem sempre me ajudou, desde a época da iniciação científica durante a graduação até a estada em Portugal. Obrigado por proporcionar momentos de descontração inesquecíveis.

Aos valiosos amigos Matheus, Emerson e Stephen pelo tempo que moramos juntos e pelo apoio em momentos necessários, assim como pelos momentos festivos!!

Aos amigos boêmios dos churrascos, bares e baladas em São Paulo: Guilherme, Gustavo, Roberto e Diogo Gaúcho.

À amiga Kátia Bee, muito obrigado por se mostrar paciente e prestativa no laboratório e também pela ajuda na monitoria de Química Farmacêutica.

Ao técnico e amigo Charles, pela ajuda com os solventes tratados e pela presteza em ajudar sempre que necessária.

Aos amigos pós-graduandos no início do doutorado: Nara, Camila, Michelli, Daniela, Mauro e Ana Cláudia. Vocês me acolheram gentilmente, muito obrigado.

Às amigas Jeanine, Carol e Vanessa, as novas pós-graduandas do LAPEN, sejam bem vindas e valeu pelo incentivo neste final de trabalho.

Ao amigo Márcio Henrique Zaim pelos conselhos oportunos e pelas suas sugestões na obtenção dos pró-fármacos e com os sistemas microparticulados.

Ao amigo Mauro Aquiles pela ajuda com a determinação voltamétrica da artemisinina e pelas infundáveis discussões filosóficas.

À Carla Menezes pela ajuda e atenção para com o presente trabalho.

À secretária Elizabete Souza Paiva, pela disposição e auxílio valiosos.

Aos secretários da pós-graduação Jorge e Elaine pela atenção e constante simpatia.

Aos amigos que me ajudaram quando estive na Italia: André, Gianni, Roberto, Kikka, Gloria e Caroline.

Aos amigos do laboratório de Polímeros em Portugal: Paula, Jorge, Antônio, Izabel, Joana, João e Zé Felipe.

Aos meus familiares que me apoiaram e incentivaram na realização deste trabalho, a especial gratidão.

A CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche BEX 1006-036.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e bolsa de iniciação científica, sem as quais a realização deste trabalho teria sido mais difícil.

A todos que de uma forma ou de outra, colaboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – Malária.....	5
2.1.1 - O ciclo de vida do agente etiológico.....	5
2.1.2 - Epidemiologia.....	7
<u>2.1.2.1 - Mundial.....</u>	7
<u>2.1.2.2 - Nacional.....</u>	7
2.1.3 - Sintomatologia.....	10
2.2 – Fármacos antimaláricos.....	11
2.2.1 - 8-Aminoquinolinas.....	13
2.2.2 - 4-Aminoquinolinas.....	14
2.2.3 - Quinolinometanóis.....	16
2.2.4 - Outros álcoois arílicos.....	16
2.2.5 - Antagonistas do ácido fólico e PABA.....	18
2.2.6 - Artemisinina e derivados.....	19
<u>2.2.6.1 - Histórico.....</u>	19
<u>2.2.6.2 - Propriedades físico-químicas.....</u>	20
<u>2.2.6.3 - Fármacos derivados da artemisinina.....</u>	21
<u>2.2.6.4 - Mecanismo de ação.....</u>	26
<u>2.2.6.5 - Toxicidade.....</u>	28
2.3 – Quitina e quitosana.....	28
2.3.1 - Derivados hidrossolúveis.....	29
2.3.2 - Aplicações.....	32
<u>2.3.2.1 - Ação hipocolesterolêmica em animais.....</u>	32
<u>2.3.2.2 - Ação hipocolesterolêmica em humanos.....</u>	33
<u>2.3.2.3 - Redução de peso.....</u>	34
<u>2.3.2.4 - Mecanismo de ação.....</u>	35
<u>2.3.2.5 – Latenciação e pró-fármacos de quitosana.....</u>	37
<u>2.3.2.6 – Microesferas.....</u>	41

2.3.2.7 – Liberação transdérmica.....	42
2.3.2.8 – Complexos entre quitosana e DNA, transfecção e desenvolvimento de vacinas.....	44
2.3.2.8.1 – Membrana assimétrica de DNA e quitosana.....	46
2.3.2.8.2 - Estudos de toxicidade.....	47
2.3.2.9 – Tratamento de osteoartrites.....	47
2.3.2.10 - Conservante e clarificante.....	48
2.3.2.11 - Aspectos regulatórios e comercialização.....	49
3 - OBJETIVOS	51
3.1 – Planejamento.....	51
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 - Materiais.....	53
4.1.1 - Reagentes e solventes.....	53
4.1.2 - Equipamentos.....	54
4.2 - Métodos.....	55
4.2.1 – Síntese.....	55
<u>4.2.1.1 - Obtenção dos derivados hidrofílicos de quitosana.....</u>	55
4.2.1.1.1 - Obtenção da N-carboximetilquitosana.....	55
4.2.1.1.2 - Obtenção da N-carboxibutilquitosana.....	56
4.2.1.1.3 - Obtenção da N-succinilquitosana.....	57
<u>4.2.1.2 - Síntese da diidroartemisinina.....</u>	58
<u>4.2.1.3 - Obtenção de microesferas de quitosana como matriz de liberação para fármacos lipofílicos e pró-fármacos de artemisinina <i>in situ</i>.....</u>	58
<u>4.2.1.4 – Obtenção de pró-fármacos poliméricos de artemisinina e derivados de quitosana hidrofílicos.....</u>	60
4.2.1.4.1 – Derivados hidrofílicos, EDC/DMAP e diidroartemisinina.....	60
4.2.1.4.2 – Derivados hidrofílicos, DIC e diidroartemisinina.....	61
4.2.1.4.3 – Diidroartemisinina, espaçante, agente condensante com posterior condensação à imina da carboxibutilquitosana.....	62
4.2.1.4.4 – Reação por meio do cloreto de ácido.....	63
4.2.2 – Análises.....	64
<u>4.2.2.1 – Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear.....</u>	64
<u>4.2.2.2 – Espectrofotometria de absorção no infravermelho.....</u>	64

4.2.2.3 – Espectroscopia de ultravioleta.....	64
4.2.2.4 – Análises viscosimétricas.....	64
4.4.2.5 – Análises termomecânicas (DMTA).....	65
4.2.2.6 – Coulter (granulômetro).....	65
4.2.2.7 – Microscopia óptica.....	65
4.2.2.8 – Microscopia eletrônica de varredura.....	65
4.2.2.9 – Espectroscopia de Massas.....	66
5 - EXPERIMENTOS REALIZADOS	67
5.1 - Caracterização da matéria-prima.....	68
5.1.1 - Amostras de quitosana.....	68
5.1.1.1 - Purificação das amostras.....	68
5.1.1.2 – Determinação do Grau de <i>N</i> -acetilação por infravermelho.....	68
5.1.1.2.1 - Preparação dos filmes.....	68
5.1.1.3 - Espectroscopia de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	69
5.1.1.3.1 – Determinação do Grau de <i>N</i> -acetilação por RMN ¹ H.....	69
5.1.1.4 – Determinação da viscosidade intrínseca.....	70
5.1.2 - Caracterização da artemisinina.....	70
5.2 - Síntese de carboxibutilquitosana.....	71
5.3 - Síntese da carboximetilquitosana.....	71
5.4 – Síntese da succinilquitosana.....	72
5.5 - Síntese da diidroartemisinina.....	73
5.6 - Obtenção de microesferas de quitosana como matriz de liberação para fármacos lipofílicos e formação de pró-fármacos de artemisinina <i>in situ</i>.....	74
5.7 – Obtenção dos pró-fármacos poliméricos utilizando diidroartemisinina e derivados hidrofílicos de quitosana.....	75
5.7.1 – Derivados hidrofílicos (imina da carboxibutilquitosana e carboxibutilquitosana), EDC e diidroartemisinina.....	75
5.7.2 – Derivados hidrofílicos (imina da carboxibutilquitosana e succinilquitosana), DIC e diidroartemisinina.....	76
5.7.3 – Diidroartemisinina, espaçante, agente condensante e imina da carboxibutilquitosana.....	77
5.7.4 – Reação por meio do cloreto de ácido.....	79

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
6.1 - Caracterização da matéria-prima	81
6.1.1 - Purificação das amostras	81
6.1.2 - Determinação do Grau de N-acetilação no IV	81
6.1.3 - Espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C	84
6.1.3.1 – Determinação do grau de N-acetilação por RMN ¹H	86
6.1.4 - Determinação da viscosidade intrínseca	89
6.1.5 - Caracterização da artemisinina	91
6.1.5.1 - Espectroscopia no Infravermelho	91
6.1.5.2 - Espectroscopia de Massas	92
6.1.5.3 - Espectroscopia de RMN ¹H	92
6.2 - Síntese da carboxibutilquitosana	95
6.2.1 – Determinação do grau de substituição da carboxibutilquitosana	105
6.3 - Síntese da carboximetilquitosana	106
6.4 – Síntese da succinilquitosana	114
6.5 - Síntese da diidroartemisinina	120
6.6 – Obtenção das microesferas de quitosana como matriz de liberação para fármacos lipofílicos	125
6.6.1 – Tipo de quitosana e velocidade de agitação	130
6.6.2 – Fármaco lipofílico (flurbiprofeno) e microesferas de quitosana visando possível formação de pró-fármaco in situ	132
6.6.3 - Formação de pró-fármaco de diidroartemisinina in situ juntamente com microesferas de quitosana	143
6.7 – Obtenção dos pró-fármacos poliméricos utilizando didroartemisinina e derivados hidrofílicos de quitosana	151
6.7.1 – Derivados hidrofílicos (imina da carboxibutilquitosana e succinilquitosana) e diidroartemisinina com EDC	151
6.7.2 – Derivados hidrofílicos (imina da carboxibutilquitosana e succinilquitosana) e diidroartemisinina com DIC	155
6.7.3 – Diidroartemisinina, espaçante, agente condensante e imina da carboxibutilquitosana	162
6.7.4 – Reação por meio de cloreto de ácido	
6.8 - Considerações finais	179

6.8.1 - Dissolução intrínseca.....	178
6.8.2 - Comparação entre diferentes perfis de dissolução.....	180
7- CONCLUSÕES.....	181
8 - PERSPECTIVAS.....	184
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185

RESUMO

A malária ainda constitui grave problema de saúde pública, estando presente principalmente em países em desenvolvimento. Acredita-se que 40% da população mundial vivam em áreas endêmicas para esta parasitose. No Brasil, cerca de 600 mil novos casos aparecem a cada ano, merecendo realce a Amazônia, que corresponde a 99% dos casos brasileiros. Dentre os agentes etiológicos, o *Plasmodium falciparum* suscita atenção especial, pois é o responsável pela malária grave. A artemisinina é agente antimalárico cujo emprego encontra-se principalmente para cepas resistentes. Embora este fármaco seja o único antimalárico cuja resistência dos plasmódios não possui relevância clínica, problemas de solubilidade comprometem sua eficácia clínica e fazem com que seja utilizado sempre em associação a antimaláricos com maior meia-vida plasmática. Com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade do antimalárico, conferindo-lhe maior hidrossolubilidade e ante ao emprego de quitosana como transportador com vistas, entre outros, a esse objetivo, planejaram-se pró-fármacos de quitosanas modificadas e artemisinina. Inicialmente, obtiveram-se quatro derivados hidrofílicos da quitosana: *N*-carboxibutilquitosana, *N*-carboximetilquitosana, *N,O*-carboximetilquitosana e *N*-succinilquitosana. A artemisinina foi empregada na forma reduzida, a diidroartemisinina, sintetizada a partir do fármaco na presença de boroidreto de sódio em várias proporções relativas ao fármaco. Procedeu-se, então, à condensação entre a diidroartemisinina e os derivados hidrofílicos obtidos por meio de quatro métodos distintos. Prepararam-se, também, microesferas para incorporar e ligar covalentemente a diidroartemisinina à quitosana. O fármaco flurbiprofeno foi utilizado como fármaco lipofílico modelo de reação. Os resultados obtidos indicam a formação de microesferas de pró-fármaco de quitosana com artemisinina, utilizando genipina como reticulante, empregando-se emulsão múltipla O/A/O juntamente com as microesferas. Os derivados obtidos, uma vez confirmada inequivocamente a estrutura, serão submetidos a ensaios de dissolução intrínseca e de atividade em malária experimental por *P. berghei*, em animais.

ABSTRACT

Malaria is still a serious problem of public health, mostly in developing countries. About 40% of the world population live in malaria endemic areas. In Brazil, about 600 thousands new cases appear every year, mainly in Amazonia, in which 99% of the cases have been registered. Among the etiologic agents, *Plasmodium falciparum* deserves special attention, as it is responsible for the severe malaria. Artemisinin is an antimalarial agent mostly used for resistant strains. Although this drug is the only antimalarial whose resistance of plasmodio has not clinical relevance, solubility problems compromise its clinical effectiveness. This is the reason why it has been used mainly in combination with other antimalarial drugs with higher $t_{1/2}$. With the goal of increasing the drug bioavailability, rendering it with higher hydrosolubility, and since modified chitosans have been used as carriers to impart this characteristic, among others, to the drugs, artemisinin prodrugs with chitosan were designed. Initially, four hydrophilic derivatives were obtained: *N*-carboxybutylchitosan, *N*-carboxymethylchitosan, *N,O*-carboxymethylchitosan and *N*-succinylchitosan. Artemisinin was utilized in its reduced form, dihydroartemisinin, synthesized from the drug in the presence of sodium borohydride in several equivalents related to the drug. The condensation between dihydroartemisinin and hydrophilic chitosan derivatives was carried out by four distinct methods. In addition, microspheres to incorporate artemisinin and to attach dihydroartemisinin to the chitosan were prepared. Flurbiprofen was used as lipophilic drug reaction model. The results indicated the dihydroartemisinin prodrug microspheres, using genipin as crosslinking agent by multiple emulsion method O/A/O, were obtained. Once unequivocally confirmed their structure, these derivatives will be submitted to intrinsic dissolution test and to biological activity determination in experimental malaria with *Plasmodium berghei*.