



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

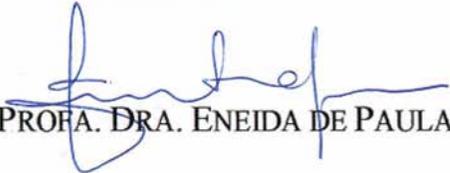


MARCELO BISPO DE JESUS

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO ANTI-
HELMÍNTICA DE PRAZIQUANTEL EM BETA-CICLODEXTRINA**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Marcelo Bispo de Jesus e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

ORIENTADORA:  PROFA. DRA. ENEIDA DE PAULA

CAMPINAS
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

J499p

Jesus, Marcelo Bispo de
Preparação, caracterização e avaliação da formulação anti-helmíntica de praziquantel em beta-ciclodextrina / Marcelo Bispo de Jesus. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Eneida de Paula.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Esquistossomose. 2. Ciclodextrinas. 3. Praziquantel. 4. Complexo de inclusão. I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Preparation, characterization and evaluation of anthelmintic praziquantel/beta-cyclodextrin complex.

Palavras-chave em inglês: Schistosomiasis; Praziquantel; Cyclodextrin; Inclusion compound.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Eneida de Paula, Maria Palmira Daflon Gremião, Francisco Benedito Teixeira Pessine.

Data da defesa: 20/03/2006.

Campinas, 20 de Março de 2006.

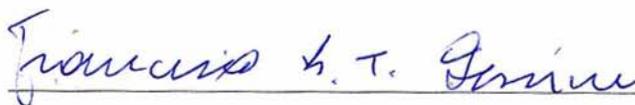
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)
Depto. de Bioquímica – IB – UNICAMP



Profa. Dra. Maria Palmira Dafton Gremião
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara



Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine
Depto. de Físico Química – IQ – UNICAMP

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto
Depto. de Química – DQI – UFLA

Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara



La Madone de Port Lligat (detalhe)

1950 Salvador Dalí

NÃO SEI...

Cora Coralina

Não sei... se a vida é curta ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:

Colo que acolhe,

Braço que envolve,

Palavra que conforta,

Silêncio que respeita,

Alegria que contagia,

Lágrima que corre,

Olhar que acaricia,

Desejo que sacia,

Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo,

é o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela não seja nem curta,
nem longa demais, mas que seja intensa,
verdadeira, pura... Enquanto durar.

Ao Mamede pela alegria de viver;

À Silvana pela fibra;

À Fernanda com amor.

AGRADECIMENTOS

Não posso deixar de agradecer àqueles que inspiraram, auxiliaram, possibilitaram e patrocinaram a difícil saída da terra natal, Pascoal & Ana, pela oportunidade no antigo Interativo, ao Seu Hélio & Dna. Sônia pelo auxílio e pela eterna força e confiança, à Juliana, pela força e confiança mesmo quando nem eu confiava em mim, ao Rudi, Breno e o Garça por terem me acolhido na Campinas sem a cobrança de honorários.

Ao Mamedera por ser uma pessoa única em todos os sentidos, totalmente gente boa e, pelo menos na teoria, sempre ensinando o mais correto. À Silvana pelas fraudas, noites em branco, deliciosa culinária, paciência, amor e dedicação. A KK pela amizade, alegria e pelo seu amor com o irmãozinho. Ao seu Durval pela fibra e vontade de viver, à Dna. Amália, minha mãe-vó, pelos cuidados na infância e pela minha primeira educação.

À Dra. Telma Pertinhez e Dr. Leonardo Fraceto pela disponibilidade do LNLS para a execução dos experimentos de RMN e suas análises.

Aos Drs. Yuji Takahata e Antonio Lino pela disponibilidade e auxílio nos cálculos computacionais.

Ao Profs. Drs. Eliana Maria Zanotti-Magalhães e Luiz Augusto Magalhães pela fé no projeto e possibilitar a execução da etapa dos testes *in vivo*, além das interessantes e proveitosas contribuições para o trabalho.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Nelson Duran da Química que sempre estavam ajudando e sempre por aqui também, à Lívia por sempre me deixar usar o rotavapor e arrumar gelo seco, além dos livros.

À Profa. Carmen pelas conversas, idéias e amizade; aos Professores Marangoni e Camillo pela amizade e papos descontraídos; ao Prof. Bonafé pelos papos malucos e de computador; ao Prof. Galembeck pelas ajudas computacionais; à Profa. Nilce pela simpatia e alegria contagiante; à Profa. Fernanda pelas aventuras computacionais e amizade. Aos Profs. da minha banca de qualificação: Profa. Carmen, Prof. Pessine e Profa. Silmara pelas valiosas contribuições ao trabalho.

A todos aqueles que leram e contribuíram em suas áreas de conhecimento para a difícil e árdua missão de escrever essa dissertação: Dr. André Okamoto (o Japonês), Dra. Juliana Minardi (a Ju), Dra. Luciana de Matos (a Luca) e o Dr. Leonardo Fraceto (o Léo).

Aos técnicos da Parasitologia Ivo e João que além da extrema competência são pessoas dotadas de um maravilhoso senso de humor, o que facilitava muito meu trabalho por lá.

Ao povo do *lab.*, passado e presente, Eneida, Nilce, Pô, Cleyton, Beth, Nonô, Ju, Morango, Haydalina, Sô, Leo, Du, Japipa, Carlos, Maribel, Dani Viu, Cíntia, Marcião, Dna Cida, a nova geração Fernanda, Ana, Josi, Giovanas e agregados o Baldasso, Netão e Ju Matoso.

Aos Amigos que fazem sempre com que a dor nos mostre algo de bom, por ordem cronológica, o Cristiano, o Ju, o Fausto, o Binho, a Má, o Rudi, a Ju, a Mary, o Luciano, a Rô.

E ainda Bruno M., Java, Santorinho, Bread, Alessandro, Barrão, Fabi, Cacá, Bitá, Hellen. Ao Fii pela casa e roupa lavada, valeu Fii e vai Curintia!!!

Very very thanks à Hellen pelas correções de inglês e amizade.

Ao apoio financeiro das agências FAPESP e CNPq sem o qual o leitinho das crianças não seria garantido.

A todos aqueles que ajudaram de qualquer forma nesses anos de trabalho e minha memória me impede de nomeá-los aqui, a vocês também um muito obrigado.

Às prestativas, bem humoradas, eficientes e psicólogas secretárias Marina e Andréia.

Àquilo que é maior que nós, caso Ele exista, não tenho dúvida que ele está do meu lado e torce muito por mim.

À Luca por tanta paciência, dedicação, sabedoria, terapias, amizade, senso crítico não cabem em palavras o quanto aprendi com você.

À Profa. Dra. Eneida de Paula, por absolutamente tudo, pelo exemplo de pessoa e profissional, pela coerência, pela competência, pelo entusiasmo dedicado ao trabalho e à Ciência, se as palavras eram poucas pra dizer o que eu aprendi com a Luca aqui não cabe nem tentar. MUITO OBRIGADO pelos 5 anos de ensinamentos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Resumo.....	xiii
Abstract	xiv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ESQUISTOSSOMOSE.....	1
1.1.1. CICLO DE VIDA DO PARASITA E ETIOLOGIA DA DOENÇA.....	4
1.1.2. PROFILAXIA E TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE.....	6
1.1.2.1. PRAZIQUANTEL.....	8
1.2. CARREADORES DE MEDICAMENTOS	16
1.2.1. CICLODEXTRINAS	17
II. OBJETIVOS.....	27
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. PREPARAÇÃO DO COMPLEXO SÓLIDO PZQ/ β -CD.....	28
3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS SÓLIDOS DE PZQ/ β -CD	28
3.2.1. MODELAGEM MOLECULAR	28
3.2.2. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA	30
3.2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	30
3.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DO PZQ EM ÁGUA.....	30
3.2.5. ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE	31
3.2.6. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	33
3.2.6.1. FUNDAMENTO TEÓRICO	33
3.2.6.2. MEDIDAS UNI E BIDIMENSIONAIS DE RMN.....	36
3.2.6.3. DIFUSÃO MOLECULAR COM GRADIENTE DE CAMPO: DOSY.....	37
3.2.7. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE: CULTURA DE CÉLULAS	39

3.3. TESTES <i>IN VIVO</i>	40
3.3.1. TESTES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>S. MANSONI</i>	40
3.3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS SÓLIDOS DE PZQ/ β -CD	43
4.1.1. MODELAGEM MOLECULAR	43
4.1.2. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA	48
4.1.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	50
4.1.4. COEFICIENTE DE ABSORTIVIDADE MOLAR (ϵ) DO PZQ EM ÁGUA.....	55
4.1.5. ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE	56
4.1.6. EXPERIMENTOS DE RMN	58
4.1.6.1. EXPERIMENTOS DE ^1H -RMN PARA A ATRIBUIÇÃO DO PZQ	58
4.1.6.2. EXPERIMENTOS DE RMN PARA A β -CD.....	62
4.1.6.3. MEDIDAS DE INTERAÇÃO PZQ/ β -CD	63
4.1.6.4. DOSY	64
4.1.6.5. ROESY.....	67
4.1.7. CULTURA DE CÉLULAS E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	69
4.2. TESTES <i>IN VIVO</i>	70
4.2.1. SUSCEPTIBILIDADE DE <i>S. MANSONI</i> A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS.....	70
V. CONCLUSÕES	73
VI. PERSPECTIVAS	75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I - CURRÍCULO	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da esquistossomose causada pelas espécies <i>S. mansoni</i> e <i>S. intercalatum</i> (A) <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i> e <i>S. mekongi</i> (B) (Blanchard, 2004).	3
Figura 2 - Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil (Rey, 2002).	4
Figura 3 - Ciclo evolutivo da esquistossomose mansônica. A. Vermes adultos acasalados. B. Eliminação dos ovos nas fezes. C. Eclosão do miracídio. D. Desenvolvimento das cercárias no interior dos moluscos (do gênero <i>Biomphalaria</i>). E. Cercária livre nadando em busca de um hospedeiro definitivo (adaptado de Rey, 2002).....	6
Figura 4 - Fármacos utilizados no tratamento da esquistossomose: a) Oxamniquina e b) Metrifonato.....	8
Figura 5 - Representação do poste proposto pela OMS para o cálculo do número de doses de PZQ (Montresor et al., 2005).....	10
Figura 6 – Praziquantel.	12
Figura 7 - (a) Estrutura geral de uma ciclodextrina, α , β e γ -CD são definidos por $n=6, 7$ e 8 , respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das ciclodextrinas (adaptado de Britto et al., 2004).....	20
Figura 8 - Representação esquemática da associação da molécula hospedeira (CD) e convidada (p-xileno) (Szejtli, 1998).	23
Figura 9 - Exemplos de estequimétricas para complexos de inclusão: A) Tolueno/ β -CD (1:1), B) difenilamina/ β -CD (1:2), C) ácido graxo de cadeia longa/ β -CD (1:3), D) complexo ácido graxo de cadeia curta + dietil éter/ β -CD (2:1) e diferentes formas de interação entre α (E), β (F) e γ -CD (G) com a prostaglandina E2.....	24
Figura 10 - Tipos de isotermas de solubilidade, de acordo com Frömming & Szejtli, 1994.....	33
Figura 11 - Estruturas geradas pelo HyperChem para a β -Ciclodextrina (A) e Praziquantel (B).	43
Figura 12 - Estruturas geradas pelo HyperChem utilizadas para início dos cálculos de minimização de energia.....	44
Figura 13 - Estruturas geradas pelo HyperChem utilizadas como entrada nos cálculos de minimização de energia. A. Borda:Borda; B. Coroa:Coroa; C. Borda:Coroa.....	45
Figura 14 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura de amostras de β -CD (A), PZQ (B), mistura física PZQ/ β -CD 1:2 (C) e 1:1 (D) e complexos de inclusão PZQ/ β -CD 1:2 (E) e 1:1 (F).	50
Figura 15 - Micrografia eletrônica de varredura da β -CD pura. Aumento de 1500x.....	51
Figura 16 - Micrografia eletrônica de varredura do PZQ puro. Aumento de 1500x.....	51
Figura 17 - Micrografia eletrônica de varredura da mistura física na razão molar 1:1. Aumento de 1500x. 52	

Figura 18 - Micrografia eletrônica de varredura da mistura física na razão molar 1:2. Aumento de 1500x.	53
Figura 19 - Micrografia eletrônica de varredura do complexo de inclusão PZQ/ β -CD, 1:1. Aumento de 1500x.	54
Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura do complexo de inclusão PZQ/ β -CD, 1:2. Aumento de 1500x.	54
Figura 21 - Determinação da constante de absorvidade molar do PZQ em 270 nm, em água.	55
Figura 22 - Isotermas de solubilidade PZQ/ β -CD (n=3).	56
Figura 23 - Isoterma de solubilidade do PZQ em presença de concentrações crescentes de β -CD (0 até 12 mM, n=3).	57
Figura 24 - Espectro de ^1H -RMN do PZQ, 1mM, 20 °C, 500MHz.	58
Figura 25 - Expansão do espectro 2D COSY (500 MHz; D_2O ; δ_{HOD} 4,87) do PZQ (1mM), 20°C.	60
Figura 26 - Espectro 2D C-HSQC (500 MHz; D_2O ; δ_{HOD} 4,87) do PZQ (1mM).	61
Figura 27 - Espectro ^1H -RMN (500 MHz; D_2O ; δ_{HOD} 4,87) da β -CD (2mM).	62
Figura 28 - Efeito do aumento da proporção de PZQ na presença de β -CD. Razão molar: a) PZQ/ β -CD 1:4; b) PZQ/ β -CD 1:1.	63
Figura 29 - Espectros de DOSY (^1H , 500MHz, BPPSTE, 25 °C) do PZQ em solução aquosa (1mM).	65
Figura 30 - Espectros de DOSY (^1H , 500MHz, BPPSTE, 25 °C) do PZQ na presença de β -CD em solução aquosa (1mM).	65
Figura 31 - Expansão do espectro bidimensional de ROESY, indicando interação entre os hidrogênios 10, 11 e 12 do PZQ com os hidrogênios H3 e H5 da β -CD.	68
Figura 32 - Representação da estrutura do complexo PZQ/ β -CD (dois resíduos de glicose foram removidos da β -CD para facilitar a visualização).	69
Figura 33 - Viabilidade celular avaliada através do MTT após 24h de tratamento com: PZQ (vermelho), β -CD (verde) e os complexos de inclusão 1:1 (preto) e 1:2 (azul).	70
Figura 34 - Susceptibilidade de <i>Schistosoma mansoni</i> aos tratamentos com salina (Controle Positivo), β -CD (Controle Negativo), PZQ em solução aquosa (175 mg/kg) e o complexo de inclusão PZQ/ β -CD (810 mg/kg).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos para Quimioterapia de Parasitoses (modificada de Goodman & Gilman, 1996). _____	11
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais (Del Valle, 2004). _____	21
Tabela 3 - Produtos contendo β -ciclodextrina aprovados e no mercado em vários países do mundo, (adaptado de Davis & Brewster, 2004). _____	25
Tabela 4 - Tratamento dos animais infectados. _____	40
Tabela 5 - Valores de Entalpias (ΔH) e energia de afinidade, no vácuo. _____	45
Tabela 6 - Valores de Entalpias (ΔH) e energia de afinidade, em água. _____	47
Tabela 7 - Atribuição dos hidrogênios do PZQ em espectro 1H -RMN. _____	59
Tabela 8 - Atribuição dos hidrogênios da β -CD em espectro 1H -RMN. _____	63
Tabela 9 - Coeficientes de difusão do PZQ e β -CD ($10^{-10} m^2.s^{-1}$). _____	66

LISTA DE ABREVIATURAS

η	Viscosidade do Meio (Pas)
ΔH	Varição de Entalpia
$^1\text{H-RMN}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
CD	Ciclodextrina
CGTase	Ciclodextrina Glicosil Transferase
C-HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
COSY	Correlation Spectroscopy
D	Coefficiente de Difusão (m^2s^{-1})
D_{ligada}	Coefficiente de Difusão do PZQ 100% Ligado a β -CD
D_{livre}	Coefficiente de Difusão do PZQ em Solução
$D_{\text{observada}}$	Coefficiente de Difusão em Presença de β -CD
DMEM	Meio de Cultura Eagle Modificado por Dulbecco
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
$E_{\text{afinidade}}$	Energia de Afinidade
f_{ligada}	fração de PZQ Ligada a β -CD
f_{livre}	fração de PZQ em Solução
GB/SA	Generalized Bohr Surface Área
I	Número Quântico de Spin Nuclear
J	Constante de Acoplamento
k	Constante de Boltzmann
K_a	Constante de Associação
k_{obs}	Constante de Velocidade Observada
L	Ligante
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MM	Mecânica Molecular
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bifenil brometo de tetrazolium
NOE	Efeito Overhauser Nuclear
NOESY	NOE Bidimensional
PZQ	Praziquantel
PZQ/ β -CD	Complexo de Inclusão Praziquantel/beta-ciclodextrina
r	Raio Hidrodinâmico da Molécula
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	Rotating Frame NOE
S	Soluto
S_0	Solubilidade do Soluto na Ausência do Ligante
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
T	Temperatura (K)
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
ϵ	Constante de Absortividade Molar
λ	Comprimento de Onda

RESUMO

As parasitoses provocadas por helmintos são um problema médico e de saúde pública em todo o mundo. Cerca de 10 % das pessoas infectadas com esquistossomose sofrem sérios danos e cerca de 500.000 mortes ocorrem no mundo todos os anos, sendo 200 milhões de pessoas infectadas pela esquistossomose em todo o mundo e 6 milhões no Brasil.

O Praziquantel (PZQ) é um anti-helmíntico de amplo espectro, ativo contra cestóides e trematódeos. É o fármaco de escolha para o tratamento de todas as formas de esquistossomose que infectam o homem no mundo, devido ao seu baixo custo e poucos efeitos colaterais. No entanto, sua solubilidade em água é muito limitada justificando, assim, a busca de novas estratégias para aumentar sua biodisponibilidade. No presente trabalho foi preparada uma formulação de PZQ contendo β -ciclodextrina (β -CD). A β -CD é um oligossacarídeo cíclico composto por 7 resíduos de glicose unidos por ligações do tipo α -1,4-glicosídicas, formando uma estrutura semelhante à de um cone truncado capaz de acomodar pequenas moléculas no interior de sua cavidade.

Foram preparados complexos de inclusão pelo método de co-precipitação. Estudos de solubilidade de fase foram utilizados para determinar a estequiometria do complexo em solução (1:1 PZQ/ β -CD) e sua constante de estabilidade foi determinada por estudos de RMN (941,00 M⁻¹). A formação do complexo de inclusão foi confirmada por calorimetria diferencial de varredura, microscopia eletrônica de varredura e 2D RMN (ROESY). Os experimentos de RMN, acompanhados por cálculos de modelagem molecular, revelaram a geometria do complexo de inclusão em solução, na qual o grupamento isoquinolínico do PZQ está inserido na cavidade da β -CD.

Por fim, foi avaliada em camundongos a susceptibilidade do *Schistosoma mansoni* (linhagem BH) ao tratamento com o PZQ livre e o complexo de inclusão PZQ/ β -CD. Os vermes adultos foram coletados pelo método de perfusão utilizando solução salina. A análise estatística (teste de Kruskal-Wallis, n=15, p<0,05) revelou uma diferença significativa na diminuição dos vermes sobreviventes após o tratamento com o complexo de inclusão em relação ao PZQ livre, indicando que a nova formulação, em β -CD, aumentou a biodisponibilidade do PZQ.

Palavras chave: esquistossomose; praziquantel; ciclodextrina; complexo de inclusão.

ABSTRACT

Infections caused by helminthes constitute a medical and public health problem of great magnitude. Approximately 10 % of the people infected by schistosome present serious injuries, leading to ca. 500,000 deaths per year, all over the world. From all the 200 million people worldwide infected with *Schistosoma*, 6 million are in Brazil.

Praziquantel (PZQ) is an anthelmintic drug with a broad activity against cestoda and trematoda; it is the drug of choice for the treatment of all forms of schistosomiasis due to its low cost and relatively few side effects. Nevertheless, the PZQ solubility in water is low, justifying the search for a controlled release system that could improve its bioavailability. Herein, we have prepared a novel pharmaceutical formulation for PZQ in β -cyclodextrin (β -CD). β -CD is a cyclic oligosaccharide, composed by 7 glucose residues of linked α -1,4-glycosidic bonds, that is able to accommodate small hydrophobic molecules into its internal cavity.

PZQ/ β -CD inclusion complexes were prepared using the coprecipitation method. Phase solubility studies were used to determine the stoichiometry of complexation in solution (1:1 PZQ/ β -CD) and the stability constant (941.00 M^{-1}). The formation of an inclusion complex between PZQ and β -CD was confirmed by differential scanning calorimetry, scanning electron microscopy and 2D NMR (ROESY). NMR experiments, assisted by molecular modeling strategies, revealed the most likely structure of the PZQ/ β -CD complex in solution, in which the isoquinolinic group is placed into the β -CD cavity.

To conclude the work, the susceptibility of the Brazilian (BH) strain of *Schistosoma mansoni* to the treatment with the PZQ/ β -CD complex was experimentally evaluated in mice. Adult worms were collected from mice by the perfusion method using saline solution. The variation among medians of worms alive was compared in mice treated with PZQ in solution or with PZQ/ β -CD complex (1:1). Statistical analysis (Kruskal-Wallis test, $n=15$, $p<0.05$) revealed a significant decrease in worms survival after treatment with the complex, indicating that the bioavailability of PZQ has improved with the complexation in β -CD, as herein proposed.

Key words: schistosomiasis, praziquantel, cyclodextrin, inclusion compounds.

I. INTRODUÇÃO

1.1. ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença causada por vermes da classe trematoda da família Schistosomatidae, dentro da qual se conhecem pelo menos cinco espécies que são capazes de infectar o homem: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mekongi* (Blanchard, 2004).

Ovos de *S. haematobium* foram encontrados em rins de múmias egípcias da 20ª Dinastia, datadas de 1250 a 1000 AC. Na China, cadáveres da Dinastia Han (206 AC a 220 DC) preservaram ovos de *S. japonicum* e, na França, foram encontrados ovos de esquistossoma em latrinas datadas de 1450 a 1550 DC (Coon, 2005). Além disso, são atribuídos à esquistossomose diversos fatos e tomadas de decisões na história da humanidade, tais como: contribuição parcial para que o exército comunista chinês não invadisse Taiwan na década de 40, são atribuídas à doença as mortes de Alexandre, o Grande e de Herodes, rei da Judéia (Coon, 2005). Atualmente, em conjunto com outras parasitoses como malária e ancilostomíase, a esquistossomose continua tendo um papel marcante na história humana, pois causa grandes prejuízos à saúde, não apenas debilitando o organismo, mas também levando a muitas mortes, devido à falta de tratamento médico e medicação correta, em tempo hábil para sobrevivência.

Foi o médico patologista alemão Theodore Maximilian Bilharz que, em 1852, descreveu pela primeira vez a esquistossomose em humanos. Após realizar a autópsia em egípcios infectados ele descobriu vermes de ambos os sexos na veia porta e na bexiga dos examinados, que ele nomeou *Distomum (Schistosoma) haematobium* (Coon, 2005). A história da esquistossomose mansônica apresenta íntima relação à da esquistossomose hematóbia, pois no final do século passado as duas eram tidas como uma única espécie (Paraense, 1959). Em 1907 foi encontrada e descrita por Luigi Western Sambon, da Escola de Medicina Tropical de Londres, uma outra espécie de *Schistosoma* que ele nomeou *S. mansoni*, em homenagem a Patrick Manson que havia sugerido, anos antes, que ovos com espículo lateral e nunca na urina poderiam representar uma nova espécie de *Schistosoma* (Paraense, 1959).

A maioria dos autores acreditam que foi no período colonial brasileiro que o *Schistosoma mansoni* desembarcou no Brasil, trazido da África pelos portugueses, em navios

I. INTRODUÇÃO

negreiros (Paraense, 1959). Encontrando aqui as condições apropriadas, a verminose se alastrou por diversas regiões do país e temos hoje no Brasil em torno de seis milhões de brasileiros infectados, conforme estimativa da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN, 2005). A **Figura 1** mostra a distribuição mundial da doença causada pelos cinco espécies de esquistossoma, A **Figura 2** explicita a distribuição da esquistossomose no Brasil, causada por *Schistosoma mansoni*. No mundo 74 países são afetados e cerca de 200 milhões de pessoas estão infectadas, a grande maioria distribuída em países em desenvolvimento, como o Brasil (**Figura 1**). Desses, 20 milhões apresentam sérias conseqüências da doença e outros 120 milhões são sintomáticos (OMS, 1996).

Embora as zonas endêmicas concentrem-se na região nordeste e nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, no estado de São Paulo a SUCEN relata que duzentos mil casos foram notificados nos últimos dez anos; porém, em sua maioria foram classificados como importados de outros estados. As principais áreas de transmissão no Estado ficam no Vale do Ribeira e no Vale do Paraíba. Além dessas, também ocorre transmissão em áreas da Grande São Paulo, na Baixada Santista, na região de Campinas, nas regiões de Araraquara e de Assis (site da SUCEN, <http://www.sucen.sp.gov.br/>).

I. INTRODUÇÃO

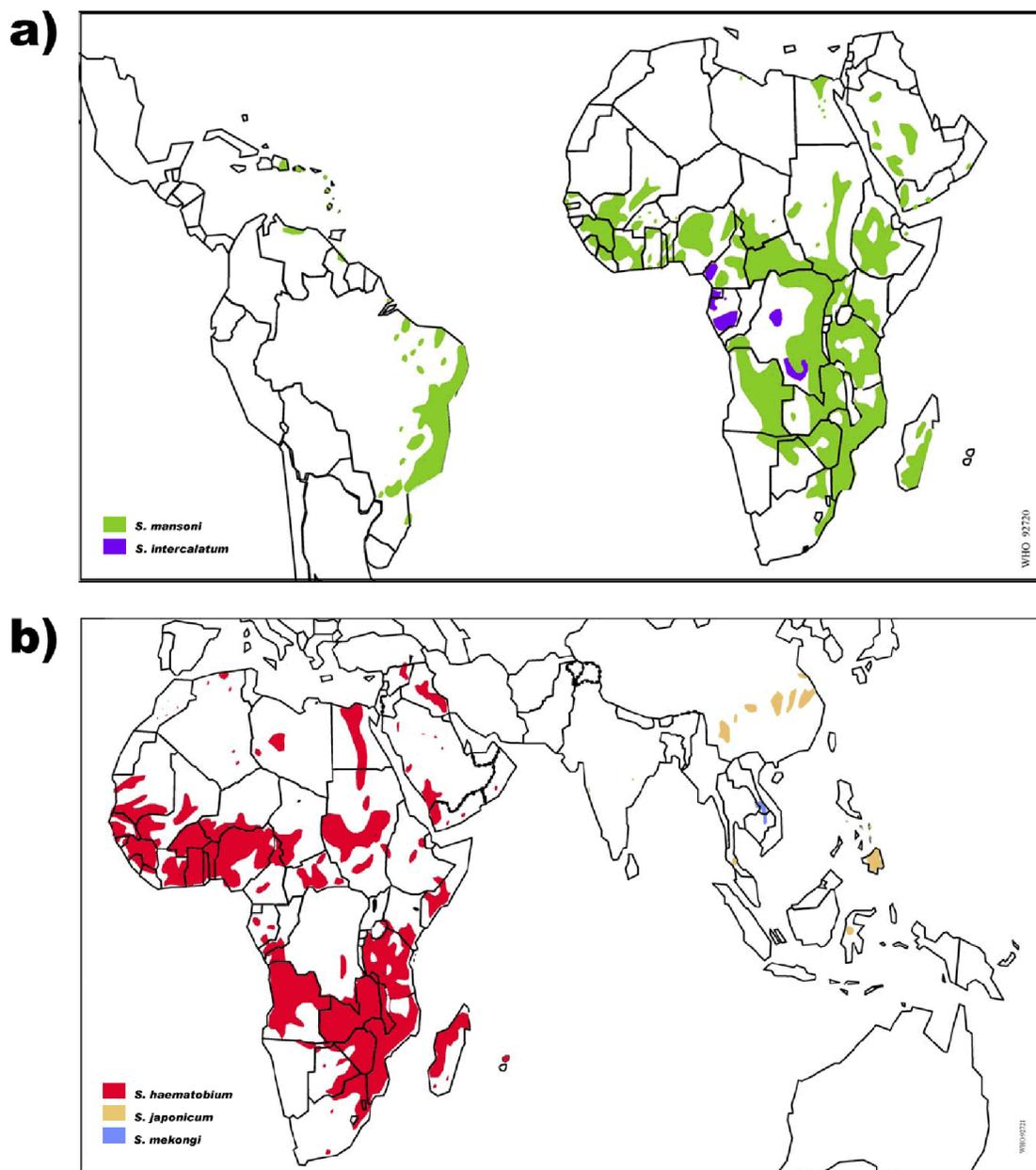


Figura 1 - Distribuição mundial da esquistossomose causada pelas espécies *S. mansoni* e *S. intercalatum* (A) *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (B) (Blanchard, 2004).

Acredita-se que, anualmente, 500 mil mortes estejam associadas à doença. Esta mortalidade seria causada por conseqüências como: câncer de bexiga, falência renal, fibroses no fígado e hipertensão no sistema porta-hepático (OMS, 1996). Apesar dos dados apresentados sobre a doença no mundo já serem bastante expressivos, tanto a Organização Mundial de Saúde como outras agências importantes da saúde em todo o mundo admitem ter

I. INTRODUÇÃO

consciência de que seus dados podem estar subestimados. Assim, o verdadeiro prejuízo causado pela doença pode ser maior do que se imagina, isto é, mais próximo ao dano causado pela malária que é de mais de 1 milhão de mortes por ano (Idro *et al.*, 2005).

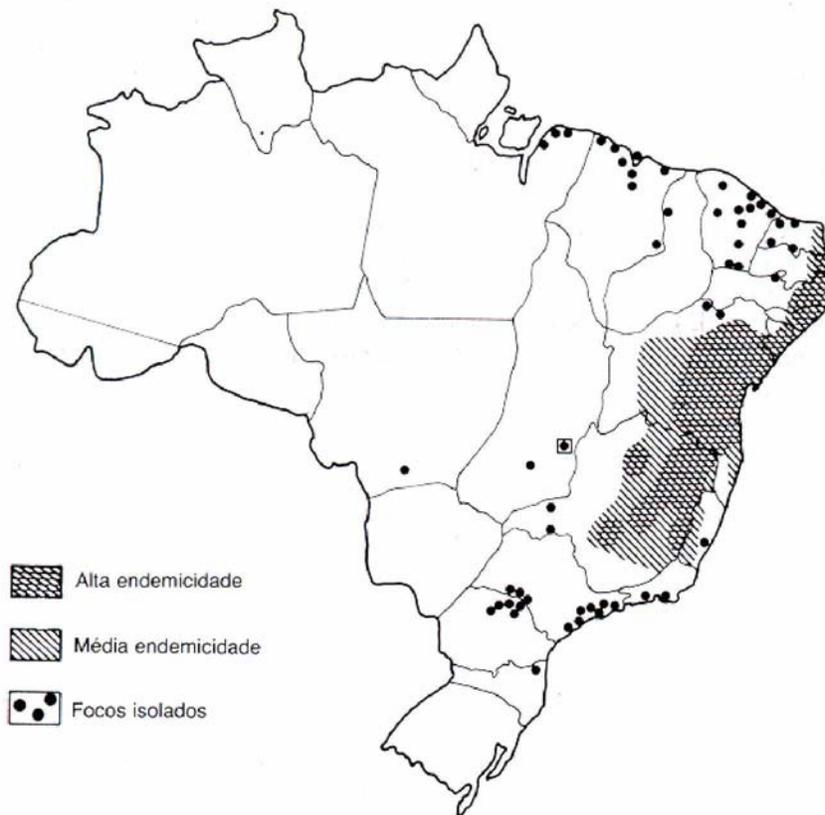


Figura 2 - Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil (Rey, 2002).

1.1.1. CICLO DE VIDA DO PARASITA E ETIOLOGIA DA DOENÇA

O *Schistosoma*, assim como outros membros de seu gênero necessitam de dois hospedeiros para completar o ciclo de vida (Coon, 2005) o que dificulta a profilaxia da doença (Prata, 1991). O *S. mansoni* tem como hospedeiro intermediário o molusco do gênero *Biomphalaria* que habita riachos (Figura 3D), valas, lagos, brejos, açudes, represas e outros locais de águas paradas e sem muita correnteza. É no molusco que a larva ciliada do parasita, chamada de miracídio (Figura 3C), realiza seu ciclo assexuado de 4 a 6 semanas e dá origem às cercárias (Figura 3E), larvas de alta motilidade e com capacidade de penetrar na pele do homem e de outros mamíferos como alguns roedores e alguns marsupiais, que são os hospedeiros definitivos, onde se completará o ciclo de vida do parasita através de reprodução sexuada (Prata, 1991; Blanchard, 2004).

I. INTRODUÇÃO

A infecção do hospedeiro definitivo se dá pelo contato com águas contaminadas, contendo cercárias (**Figura 3**). As cercárias desenvolvem-se nos moluscos, que por sua vez vivem em águas paradas e limpas com grande quantidade de matéria orgânica em suspensão (Coon, 2005).

A cercária ao penetrar a pele com o auxílio de enzimas líticas, perde sua cauda e passa a ser chamada de esquistossômulo que, por sua vez, atinge a corrente sanguínea e se aloja nos pulmões e após nove dias passa para o fígado. Desde a infecção são necessários cerca de 30 dias para que o esquistossomo atinja sua fase adulta (Blanchard, 2004). Durante a cópula a fêmea do verme adulto se aloja em uma fenda abdominal do macho adulto (**Figura 3A**), chamada canal ginecóforo, dando continuidade ao ciclo, que tem em média pouco mais de 40 dias, desde a infecção pela cercária até a postura dos primeiros ovos, que são eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo (Prata, 1991).

Os ovos possuem um espículo lateral que os auxilia a atravessar vasos e tecidos para atingir a luz do trato gastrointestinal e, por fim, o meio externo (**Figura 3B**). Entretanto, poucos ovos chegam ao meio externo, pois a maioria deles fica retido no hospedeiro. Esses ovos retidos se alojam principalmente no intestino, outros são levados pela corrente sanguínea e acabam retidos no fígado ou pulmões, e uma minoria atinge outros órgãos e tecidos, como estômago, miocárdio, pâncreas, testículos, cérebro, medula, baço, rins, etc. A lesão causada pela fixação dos ovos nesses órgãos levará a uma resposta inflamatória, seguida de um processo de fibrose característico em torno dos ovos que recebe o nome de *granuloma esquistossomótico* (Prata, 1991; Blanchard, 2004; Coon, 2005). Os granulomas são tidos como as principais e mais duradouras conseqüências da doença (Coon, 2005). Caso haja reinfecção o homem pode continuar eliminando ovos durante anos, agravando ainda mais o quadro patológico, o que leva a uma obstrução de vasos, neoformação vascular, hipertensão da veia porta bem como acentuada reação imune (Prata, 1991; Coulter, 2002).

Em humanos não há dados de indivíduos naturalmente imunes à doença, de forma que todos são, potencialmente, suscetíveis (Prata, 1991).

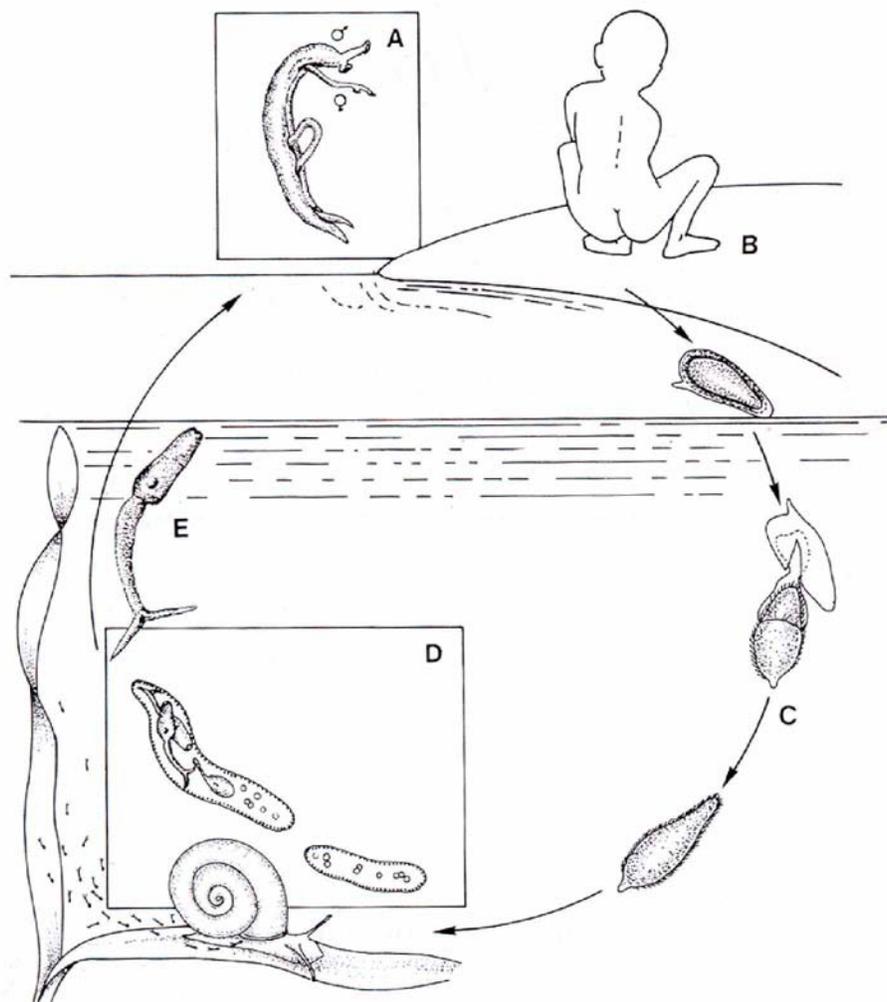


Figura 3 - Ciclo evolutivo da esquistossomose mansônica. A. Vermes adultos acasalados. B. Eliminação dos ovos nas fezes. C. Eclosão do miracídio. D. Desenvolvimento das cercárias no interior dos moluscos (do gênero *Biomphalaria*). E. Cercária livre nadando em busca de um hospedeiro definitivo (adaptado de Rey, 2002).

1.1.2. PROFILAXIA E TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

A principal dificuldade encontrada na profilaxia da esquistossomose é a existência de dois hospedeiros. No entanto, providências como uma educação em higiene e saúde (para evitar defecação em locais próximos a fontes de água), uma higiene sanitária funcional e um tratamento adequado das águas, seriam suficientes para controlar a disseminação da doença. Em segundo plano, o controle da população dos caramujos também poderia ajudar, porém, esta opção é muito dispendiosa (Coulter, 2002). Em países como o Brasil, existem diversas regiões onde há reservatórios naturais da doença, em que a higiene sanitária encontra-se em estado precário e onde o tratamento das águas não é adequado. Esses fatores dificultam muito

I. INTRODUÇÃO

o controle e a prevenção da doença. Desta forma é possível estabelecer uma relação clara e direta entre as condições sócio-econômicas e a incidência da doença (Prata, 1991) o que se reflete também na distribuição mundial da doença, que afeta principalmente países tropicais e em desenvolvimento, como mostrado na **Figura 2** (Bergquist, 2002).

Uma vez instalada a parasitose, seu tratamento medicamentoso seria ideal se iniciado logo após ocorrer a infecção, pois a doença pode causar lesões irreversíveis. A administração de fármacos é importante porém limitada, dependendo do estágio de desenvolvimento do parasito. Diversos fármacos já foram utilizados para o tratamento da esquistossomose, como o metrifonato e a oxamniquina (**Figura 4**), entretanto o praziquantel (PZQ, **Figura 6**) tornou-se mundialmente o mais importante (Bergquist, 2002).

No Brasil dois fármacos são de uso consagrado para o tratamento da esquistossomose: a oxamniquina e o PZQ. A oxamniquina tem um poder anti-helmíntico bastante grande, porém sua administração oral em crianças pode causar tonturas, náuseas e, mais raramente, alucinações. A administração por via intramuscular de oxamniquina em adultos tem efeitos indesejados como o edema, causando dor intensa no local da injeção que pode perdurar por semanas (Davis, 1993).

O PZQ vem sendo utilizado no Brasil como segundo fármaco de escolha no tratamento medicamentoso da esquistossomose (Camargo & Neves, 2001), apesar de levar a menos efeitos indesejáveis que a oxamniquina. Esta peculiaridade da terapêutica medicamentosa da esquistossomose no Brasil (já que o PZQ é o fármaco de escolha mundial) é atribuída a uma estratégia das autoridades em saúde pública nacionais que não expõem a população ao PZQ para evitar o desenvolvimento de resistência medicamentosa ao mesmo, preservando-o como opção para a oxamniquina (Magalhães, 2005).

A seqüência de genes ativos do *S. mansoni* foi determinada por cientistas brasileiros¹ e americanos². O mesmo foi realizado para o *S. japonicum* por um grupo de cientistas chineses³, sendo este tipo de investigação considerada crucial ao combate da doença (Verjovski-Almeida & DeMarco, 2004), pois com as informações obtidas através do seqüenciamento, espera-se desvendar alvos moleculares para um desenvolvimento mais racional de novos fármacos e o desenvolvimento de vacinas (McManus & Bartley, 2004).

¹ <http://verjo18.iq.usp.br/schisto/>

² <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/sma1/intro.shtml>

³ <http://schistosoma.chgc.sh.cn/sj-old/index.htm>

I. INTRODUÇÃO

1.1.2.1. PRAZIQUANTEL

Histórico

Atualmente, três os fármacos são utilizados no tratamento da esquistossomose em todo o mundo: a oxamniquina, o metrifonato (**Figura 4**) e o praziquantel (**Figura 6**).

A oxamniquina (**Figura 4**) é obtida a partir do precursor sintético 2-isopropil-amino-metil-6-metil-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroquinolina através de uma hidroxilação, catalisada pelo fungo *Aspergillus sclerotiorum*, gerando o 1,2,3,4-tetrahydro-2-(isopropilamino) metil(-)7-nitro-6-quinolino metanol (oxamniquina), um pó laranja claro (Davis, 1993). A oxamniquina é efetiva apenas no tratamento da espécie *Schistosoma mansoni*, apresentando uma eficácia comparada à do PZQ; entretanto ligeiramente menor (Richter, 2003), além de apresentar algumas limitações farmacológicas, pois não pode ser utilizada durante a gravidez, nem por pacientes com história de epilepsia e, ainda, pode causar vertigem e sonolência de 24 a 48h após a administração (Davis, 1993). Há também relatos de carcinogenicidade por oxamniquina em doses acima de 150 mg/kg, em camundongos e hamsters (Campbell & Rew, 1986). A queda na demanda da oxamniquina pode colocar em risco a sua produção, como já vem acontecendo com o metrifonato em algumas regiões do mundo (Richter, 2003)

O metrifonato (**Figura 4**) é o *O-O*-dimetil-2,2,2-tricloro-1-hidroxietilfosfonato um composto organofosforado ativo apenas para o tratamento da esquistossomose causada pelo *Schistosoma haematobium*. Testes comparativos entre o metrifonato e o PZQ para a redução da morbidade, causadas por *S. haematobium*, demonstraram melhores resultados com o PZQ. Outra limitação é a necessidade de uma segunda dose na terapia com o metrifonato, enquanto que o PZQ é efetivo em terapias de dose única (Richter, 2003).

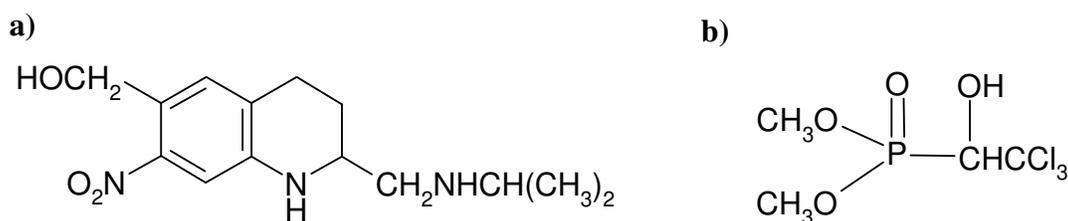


Figura 4 - Fármacos utilizados no tratamento da esquistossomose: a) Oxamniquina e b) Metrifonato.

As limitações desses fármacos levaram os laboratórios Bayer a buscar um fármaco de espectro mais amplo, ativo contra todas as formas de esquistossomose (Pica-Mattoccia &

I. INTRODUÇÃO

Cioli, 2003). No início da década de 70, dentre os diversos protótipos testados, o EMBAY 8440, posteriormente chamado de praziquantel, mostrou-se promissor (Andrews, 1981), sua atividade anticestoda e antitrepatoda foi publicada em 1977 e os primeiros testes com voluntários iniciaram-se em 1978 (Leopold *et al.*, 1978; Pica-Mattoccia & Cioli, 2003).

Desde então o PZQ tornou-se o fármaco de escolha para o tratamento de esquistossomose em todo mundo e é comercializado com os nomes de Cestox[®] e Cisticid[®] (Campbell & Rew, 1986). Diversas razões justificam seu uso, como sua alta eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma* e também contra a classe *Cestoda*, e por apresentar poucos efeitos colaterais a curto e longo prazo, aumentando sua aceitação com um preço competitivo, principalmente após a queda da patente (King & Mahmoud, 1989; Cioli *et al.*, 1995; Pica-Mattoccia & Cioli, 2003; Blanchard, 2004; Coon, 2005).

Dose e administração

No Brasil, o próprio Ministério da Saúde (Fiocruz) produz o PZQ, que é apresentado em forma de comprimidos de 600 mg, para o tratamento da esquistossomose.

A dose de praziquantel considerada ótima pela OMS é de 40 a 60 mg/kg e uma dose entre 30 e 60 mg/kg é considerada aceitável (Montresor *et al.*, 2005). Em algumas regiões se utiliza um poste com sucessivas divisões para determinar o número de doses proporcional a sua altura que cada indivíduo deve receber. Assim, um indivíduo como o mostrado na **Figura 5** receberia duas doses. Indivíduos com o peso maior que três vezes o desvio padrão para a sua altura não devem utilizar esse parâmetro e todos aqueles maiores que 178 cm recebem 5 doses (Montresor *et al.*, 2005).

I. INTRODUÇÃO

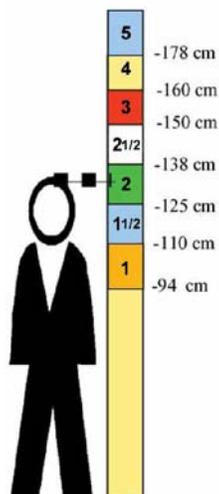


Figura 5 - Representação do poste proposto pela OMS para o cálculo do número de doses de PZQ (Montresor *et al.*, 2005).

No relatório de 2001 da “MSH Guia Internacional Indicador de Preços de Fármacos” (MSH International Drug Price Indicator Guide) o preço médio do PZQ era de US\$ 0,101/comprimido, chegando a custar US\$ 0,0751/comprimido para a compra de pacotes contendo 500 comprimidos (MSH⁴). O catálogo de dezembro de 2001 da Associação Internacional de Farmácias (International Dispensary Association) – Amsterdã vendia um frasco com 500 comprimidos por € 41,50, ou US\$ 0,061/comprimido (Cioli & Pica-Mattocchia, 2003), o que mostra que o PZQ possui um preço muito competitivo, principalmente após a queda de sua patente. Após a produção do PZQ em formulações genéricas por diversas companhias ao redor do mundo, este atingiu preços menores que os da oxamniquina (Richter, 2003).

Devido a esses motivos o PZQ é indicado como o fármaco de escolha para diversas parasitoses além da esquistossomose como mostra a **Tabela 1**.

⁴ <http://www.msh.org/>

I. INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Fármacos para Quimioterapia de Parasitoses (modificada de Goodman & Gilman, 1996).

PARASITA	DROGA DE ESCOLHA	
	1^a	2^a
<i>Taenia saginata</i>	Praziquantel	Niclosamida
<i>T. solium</i>	Praziquantel	Niclosamida
<i>Diphyllobothrium latum</i>	Praziquantel	Niclosamida
<i>Hymenolepis nana</i>	Praziquantel	Niclosamida
<i>S. haematobium</i>	Praziquantel	Metrifonato
<i>S. japonicum</i>	Praziquantel	-
<i>S. mansoni</i>	Oxamniquina*	Praziquantel*
<i>S. mekongi</i>	Praziquantel	-
Parasitas que podem atingir o intestino		
<i>Fasciolopsis buski</i>	Praziquantel	-
<i>Heterophyes heterophyes</i>	Praziquantel	-
<i>Metagonimus yokogawai</i>	Praziquantel	-
Parasitas que podem afetar o fígado		
<i>Clonorchis sinensis</i>	Praziquantel	-
<i>Opisthorchis felineus</i>	Praziquantel	-
<i>O. viverrini</i>	Praziquantel	-
Parasitas que podem afetar o pulmão		
<i>P. westermani</i>	Praziquantel	-
<i>P. kellicotti</i>	Praziquantel	-

* Embora na citação original (Goodman & Gilman, 1996) o PZQ seja o fármaco de primeira escolha para o tratamento do *S. mansoni*, no Brasil é a oxamniquina.

Foram esses fatores que levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a adicionar o PZQ à Lista Modelo de Drogas Essenciais (Model List of Essential Drugs) considerando-o como uma droga efetiva contra todas as formas de esquistossomose (Kasim *et al.*, 2003).

Química

O Praziquantel é o 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11*b*-hexahidro-4*H*-pirazino(2,1-*a*)isoquinolin-4-ona, um pó branco, sem cheiro e de gosto amargo, que apresenta massa molar de 312,4 e fórmula estrutural C₁₉H₂₄H₂O₂. O PZQ é estável e possui ponto de fusão entre 136-140 °C (Campbell & Rew, 1986; Davis, 1993; Cioli & Pica-Mattoccia, 2003); sua solubilidade em água é muito baixa: cerca de 1 mM ou 0,3 mg/mL (Kassim, 2004).

O carbono 14 da molécula do PZQ é assimétrico, destacado com um asterisco na **Figura 6**, e a preparação comercial é uma mistura racêmica composta igualmente pelos isômeros “levo” R(-) e “dextro” S(+). Apenas o enantiômero R(-) apresenta atividade

I. INTRODUÇÃO

esquistossomicida, enquanto ambos possuem toxicidade equivalente (Cioli & Pica-Mattocchia, 2003).

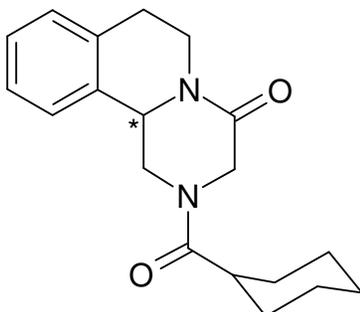


Figura 6 – Praziquantel.

Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do PZQ ainda não foi totalmente elucidado (Blanchard, 2004). Sabe-se que o fármaco é absorvido pelo verme adulto por difusão simples, aumentando a permeabilidade da membrana celular ao cálcio o que gera efeitos primários como contrações tetânicas, seguidas de paralisia da musculatura do verme. Em etapa posterior observa-se vacuolização e desintegração do tegumento o que causa a morte do parasita (Pax *et al.*, 1978; Campbell & Rew, 1986; Goodman & Gilman, 1996).

Esquistossomos adultos expostos a concentrações terapêuticas de PZQ (1 μM ou 0,3 $\mu\text{g/mL}$) apresentam contração quase que instantânea, com um tempo médio de menos de 12 segundos para que a musculatura longitudinal sofra os efeitos máximos. Essa contração resulta em paralisia total do verme, a qual atinge 95 % dos vermes em cerca de 5 min. após administração oral em camundongos. É provável que os vermes paralisados sejam arrastados pela corrente sanguínea para o interior do fígado, minutos após a administração do fármaco (Campbell & Rew, 1986).

A absorção do PZQ pelo tegumento do verme parece ser essencial para sua atividade biológica. Acredita-se que a lipofilicidade do PZQ facilite sua incorporação na membrana do parasita. Por isso, outros vermes como a *Fasciola* e o *Paragonimus*, que apresentam um tegumento mais refratário à incorporação do PZQ são mais resistentes ao mesmo (Coles, 1979; Andrews, 1985).

I. INTRODUÇÃO

O PZQ é ativo contra esquistossomos nos dois primeiros dias após a infecção; porém, durante as quatro semanas seguintes o parasita permanece não susceptível ao fármaco (período refratário), voltando a responder ao tratamento apenas quando o verme atinge sua fase adulta. Isto se deve às diferentes composições do tegumento do verme, durante seus estágios de desenvolvimento dentro do hospedeiro definitivo (Hagan *et al.*, 2004). O período refratário constitui a maior limitação ao tratamento com o PZQ e pode ser motivo de indicações de resistência ao fármaco. Por esse motivo sugere-se formas de tratamento onde a dose seja administrada durante 3 semanas, após as quais é feito um exame para confirmar o sucesso do tratamento (Pica-Mattochia & Cioli, 2003).

Toxicidade e Efeitos colaterais

A toxicidade do PZQ foi testada em ovelhas, ratos e macacos rhesus e apresentou resultados bastante satisfatórios (Frohberg, 1984), i.e., não causou problemas sistêmicos, ou na embriogênese, nem foram relatados grandes efeitos adversos nesses mamíferos (Davis, 1993). Testes de mutagênese e carcinogênese também apresentaram resultados negativos (Davis, 1993; Blanchard, 2004). O PZQ apresenta uma DL₅₀ de 2454 mg/kg para camundongos e 2840 mg/kg para ratos, em administrações por via oral (Campbell & Rew, 1986).

O PZQ não exerce quaisquer efeitos no homem em doses terapêuticas (Rang, 2004) e testes em humanos mostraram, convincentemente, que o PZQ possui um poder mutagênico muito baixo (Dayan, 2003).

Uma grande porcentagem dos pacientes submetidos ao tratamento com PZQ apresenta efeitos colaterais (30-60 %) devido à morte dos vermes; entretanto, esses efeitos são transitórios e brandos, desaparecendo dentro de 24 h. Os efeitos mais comuns são dores de cabeça, náuseas, anorexia, vômitos, dores abdominais e epigástricas, diarreia com ou sem sangue, febre, mialgia, moleza, sonolência, falta de sono e, mais raramente, erupções com edema na pele (Cioli & Pica-Mattochia, 2003; Goodman & Gilman, 1996).

A frequência e a intensidade dos efeitos colaterais estão diretamente relacionados com a carga parasitária e o estágio de desenvolvimento dos vermes, uma vez que muitas das reações são decorrentes da morte dos esquistossomos e dos metabólitos liberados com sua morte. Sintomas como diarreia com presença de sangue e urticária são mais comuns em

I. INTRODUÇÃO

áreas de grande incidência da doença (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003; Goodman & Gilman, 1996).

Metabolismo

O PZQ é rapidamente absorvido e após uma dose oral, o fármaco sofre um severo metabolismo de primeira passagem (Campbell & Rew, 1986; Cioli & Pica-Mattoccia, 2003; Dayan, 2003). Por isso a administração após uma refeição pode aumentar sua biodisponibilidade e vem sendo recomendada, sempre que possível. Carboidratos também demonstraram aumentar a biodisponibilidade do fármaco (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003; Dayan, 2003). Após 15 min. da administração já é possível quantificar o PZQ na corrente sanguínea, sendo que seu pico sérico máximo ocorre entre 1 e 2 h, em voluntários sadios; este pico pode estar deslocado para tempos maiores em pacientes contaminados, cujas funções hepáticas estejam comprometidas. As concentrações plasmáticas máximas, após uma dose de 40 mg/kg está entre 0,2 e 2 µg/mL. Cerca de 80 % de todo fármaco circulante encontra-se ligado nas proteínas plasmáticas (Goodman & Gilman, 1996) e sua eliminação ocorre principalmente pela urina e fezes, com mais de 80 % após 24 h (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003).

Uma vez no organismo de um mamífero, o PZQ será metabolizado principalmente pelo fígado, para ser eliminado (Andrews, 1985), sendo o principal responsável pelo metabolismo o citocromo P450, particularmente nas isoformas 2B1 e 3A (Giorgi *et al.*, 2001). Os metabólitos do PZQ são compostos mono- di- e tri-hidroxilados, sendo o mais abundante um análogo do 4-hidroxiciclohexilcarbonil (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). Todos os metabólitos são inativos ou apresentam uma atividade esquistossomicida muito baixa (Dayan, 2003) e, por isso, considera-se apenas a atividade do PZQ intacto. Estes resultados mostram que estudos que levem à maior permanência da molécula do PZQ intacta no organismo ou medidas que impeçam a sua metabolização são desejáveis, assim o mesmo terá mais tempo para atuar no organismo do paciente (Wang *et al.*, 1983). O PZQ não metabolizado tem uma meia-vida de 1-1,5 h até sua eliminação, enquanto que seus metabólitos têm uma meia-vida de aproximadamente quatro horas (Andrews *et al.*, 1985). Esses dados foram obtidos com animais de laboratório e guardam boa correlação com aqueles encontrados em humanos (Leopold *et al.*, 1978; Patzshke *et al.*, 1979).

I. INTRODUÇÃO

Resistência

Os primeiros relatos de resistência ao tratamento com PZQ vieram do Senegal em 1995 onde o fármaco produziu taxas de cura muito baixas (18-39 %). A suspeita da resistência foi confirmada com tratamento posterior dos indivíduos com oxamniquina que, em dose relativamente baixa (20 mg) levou a uma taxa satisfatória de cura (79 %) (Cioli, 1998; Pica-Mattocchia & Cioli, 2003; Hagan, *et al.*, 2004). Em outros locais de grande utilização do fármaco, como no Egito foram relatadas, em 1996, linhagens de vermes que apresentam graus de resistência ao PZQ (Pica-Mattocchia & Cioli, 2003). Estes relatos de resistência ao PZQ, ainda sem significância clínica prática, não podem ser ignorados (Bergquist, 2002), pois falhas no tratamento são os primeiros indicativos de que a utilidade de um fármaco está chegando ao fim (Hagan, *et al.*, 2004). Ovos de vermes resistentes ao tratamento foram isolados das fezes dos pacientes e testes posteriores *in vivo* e *in vitro* foram realizados, para verificar possíveis causas da resistência. Entretanto, não foram encontradas evidências significativas da existência de uma resistência seletiva ao fármaco, que fosse geneticamente transmissível (Cioli, 1998).

Relatos de resistência não são exclusivos do PZQ. Estudos pioneiros no Brasil (Katz *et al.*, 1973) constataram resistência do *Schistosoma mansoni* ao tratamento com oxamniquina. Os mesmos resultados foram obtidos por Clark e colaboradores, em 1976, em alguns países da África e, Coles e colaboradores, em 1987, no Quênia (Conceição *et al.*, 2000). Recentemente, Conceição e colaboradores (2000) em estudos realizados com a linhagem MAP de *Schistosoma mansoni*, demonstraram que estes vermes apresentam resistência significativa à oxamniquina, com maior suscetibilidade ao PZQ (Arena, 1999).

Limitações

A molécula de PZQ é muito hidrofóbica, portanto muito pouco solúvel em água. Essa característica causa alguns problemas, como os relacionados ao seu estado físico, em formulações genéricas e também problemas de biodisponibilidade. Este é, portanto, um exemplo de molécula para a qual são necessárias pesquisas que visem aumentar sua solubilidade em água. Com isso, seria possível reduzir as altas doses terapêuticas utilizadas atualmente nos programas governamentais de quimioterapia de massa, em países subdesenvolvidos (El-Arini & Leuenberger, 1998; Dayan, 2003).

I. INTRODUÇÃO

De fato, diversos trabalhos na área alertam que, não somente o desenvolvimento de novas formulações para o PZQ, como também de novos fármacos ou de vacinas seriam estratégias fundamentais para conter essa parasitose que, apesar de não estar em expansão, tampouco apresenta redução significativa no número de infectados, sendo em todo mundo cerca de 200 milhões, desde 1973 (Hagan *et al.*, 2004).

1.2. CARREADORES DE MEDICAMENTOS

Com o advento da nanotecnologia tornou-se possível o uso de diversos tipos de materiais como carreadores de fármacos, dentre os quais é possível destacar: (1) os de origem biológica como os lipídeos, peptídeos, oligossacarídeos; (2) polímeros como o poli-ácido láctico, poli-amidoamina, poli-ácido glicólico; (3) baseados em silicone, como o próprio silicone e dióxido de silicone; (4) baseados em carbono, como os fulerenos e nanotubos e ainda (5) estruturas metálicas de ouro, prata, paládio ou platina, que são capazes de formar nanopartículas e nanoesferas (Hughes, 2005).

Para a indústria farmacêutica a aplicação da nanotecnologia para o desenvolvimento de sistemas de carregamento de fármacos representa uma ferramenta estratégica para expansão da terapêutica (Sahoo & Labhasetwar 2003) e movimenta um mercado multibilionário (Pannier & Shea, 2004). A demanda de sistemas de liberação de fármaco (*drug delivery*), nos Estados Unidos, teve um crescimento anual de cerca de 9 % e deverá movimentar mais de US\$ 82 bilhões em 2007 (Sahoo & Labhasetwar 2003).

Os sistemas carreadores de fármacos proporcionam diversas vantagens em relação a administração do fármaco livre, como: manutenção de níveis plasmáticos mais duradouros, o direcionamento ao tecido ou à célula, diminuição significativa de efeitos colaterais, diminuição da dose necessária para desempenhar um determinado efeito e manutenção da estabilidade de fármacos lábeis ou de metabolização rápida (Pannier & Shea, 2004). Além disso, novas formulações de fármacos clássicos podem reduzir seus efeitos colaterais e aumentar sua aceitabilidade pelos pacientes, economizando-se, assim, grandes investimentos em relação ao desenvolvimento de novas moléculas (Hughes, 2005).

Becket e colaboradores (1999) propuseram o uso de ciclodextrinas para carrear o PZQ. Eles demonstraram, através de estudos de isoterms de solubilidade, que o PZQ tem sua solubilidade em água aumentada quando interage com ciclodextrinas e determinaram as

I. INTRODUÇÃO

constantes de associação para os complexos de inclusão entre o PZQ e a α , β e γ -ciclodextrinas como, 56,2, 396,9 e 15,2 M⁻¹, respectivamente. Assim, embora o PZQ seja capaz de interagir com as diferentes ciclodextrinas naturais, ele estabelece uma interação mais estável com a β -ciclodextrina, embora nem a toxicidade, nem a atividade esquistossomicida dessa nova formulação houvessem sido avaliadas por aqueles autores (Becket *et al.*, 1999).

A incorporação do PZQ em lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina foi relatada pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Palmira Gremião da UNESP – Araraquara. Estes estudos demonstram que a atividade esquistossomicida de PZQ foi aumentada tanto em testes com camundongos infectados como em meios de cultura do *S. mansoni*, demonstrando o potencial da formulação lipossomal de PZQ e, ainda, sugerindo a utilização de novas vias de administração para o fármaco, como alternativa ao tratamento convencional da esquistossomose (Mourão *et al.*, 2005).

1.2.1. CICLODEXTRINAS

Definição

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que, recentemente, foram reconhecidos como excipientes farmacêuticos muito práticos sendo sua aplicação farmacêutica mais comum destinada ao aumento da solubilidade de fármacos (Loftsson & Brewster, 1996).

O amido utilizado para a produção de ciclodextrinas é, geralmente, derivado do milho mas também pode ser obtido a partir de batatas ou outras fontes. As unidades de D-glicopirranose do amido são degradadas pela enzima glicosiltransferase produzida por quebra da cadeia e rearranjos moleculares, oligômeros cíclicos de α -1,4-D-glicopirranose, conhecidos como ciclodextrinas (**Figura 7a**) (Davis & Brewster, 2004).

Histórico

Moléculas conhecidas por ciclodextrinas (CD) são um dos carreadores mais estudados nos dias de hoje. Também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger, as CDs foram descritas por Villiers, em 1891, que enquanto estudava o *Bacillus amylobacter* isolou uma pequena quantidade de uma substância cristalina, que ele chamou de

I. INTRODUÇÃO

celulosina, devido a sua semelhança com a molécula de celulose (Del Valle, 2004). Nesse mesmo trabalho determinou-se a fórmula estrutural $(C_6H_{10}O_3).H_2O$ dessas substâncias cristalinas, o que posteriormente levou outros autores a interpretarem a amostra de Villiers como sendo uma mistura de diversas ciclodextrinas e, possivelmente, alguns contaminantes. Em 1903, Schardinger isolou dois tipos desses produtos cristalinos, os quais ele nomeou de dextrinas A e B e que possuíam um baixo poder redutor (característica que foi compreendida somente quando a estrutura cíclica das mesmas foi determinada). O mesmo autor (Schardinger, 1911) demonstrou posteriormente que linhagens de *Bacillus macerans*, eram capazes de produzir grandes quantidades de dextrinas cristalinas, e que cerca de 25-30 % do amido utilizado como fonte de carboidratos era convertido nestas moléculas. A partir de então, ele adotou a denominação dextrina cristalizada α e dextrina cristalizada β e somente em 1935 a forma γ foi isolada (Del Valle, 2004).

Tilden e Hudson, em 1939, demonstraram que uma enzima do tipo amilase, obtida do *Bacillus macerans*, era responsável pela produção das ciclodextrinas. Estes autores comprovaram que as ciclodextrinas não eram produtos do metabolismo das bactérias mas sim resultado da ação de enzimas extracelulares que hidrolisavam o amido e compostos relacionados, nestes derivados (Bertolini, 1998). Sabe-se, atualmente, que estas enzimas, as Ciclodextrina Glicosil Transferases (CGTase) são produzidas por uma grande variedade de microorganismos como: *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* e *Alkalophilic bacillus* (Szejtli, 1998).

As estruturas das CDs naturais só foram elucidadas posteriormente: α e β em 1942, e γ em 1948, demonstrando que eram derivados cíclicos, explicando seu baixo poder de redução, e que eram formadas de 6, 7 ou 8 resíduos de glicose (**Figura 7a**), respectivamente. Juntamente com essas informações veio a observação de que essas moléculas apresentavam uma interessante peculiaridade de formar complexos de inclusão molecular. Cramer em 1950 descobriu que as ciclodextrinas eram capazes de catalisar reações específicas, o que possibilitou sua utilização como sistemas miméticos de sítios enzimáticos de catálise (French, 1957). Outras formas naturais δ -, ζ -, ξ - e η -ciclodextrinas contendo de 9 a 12 resíduos de glicose foram isoladas posteriormente; porém, demonstrou-se que são menos importantes, por serem de difícil obtenção e não apresentarem a mesma capacidade de inclusão molecular, uma vez que são maiores e não possuem rigidez mínima do anel para

I. INTRODUÇÃO

garantir formato fixo da cavidade (Del Valle, 2004).

Freudenberg e colaboradores, em 1953, obtiveram a primeira patente de uma formulação contendo CD. Nela os autores descrevem os principais benefícios da utilização de ciclodextrinas como carreadores de fármacos, dentre os quais podemos destacar o aumento da solubilidade aquosa do fármaco, efeito protetor à oxidação e redução ou perda da volatilidade (Szejtli, 1998; Brewster & Davis, 2003).

A partir de 1970 houve um crescimento logarítmico no número de publicações envolvendo ciclodextrinas como carreadores, principalmente depois que estudos de toxicidade demonstraram que efeitos indesejáveis e inicialmente atribuídos as ciclodextrinas na verdade eram originados de impurezas e de formas inadequadas de administração das mesmas (Szejtli, 1998).

Enquanto, no início da década de 70, a β -CD custava em torno de US\$ 2.000/kg, em 2002 este custo baixou para US\$ 3-4/kg, para uso industrial (Szejtli, 1998; Biber *et al.*, 2002). Além disso, é possível encontrar uma vasta gama de derivados das CDs naturais com propriedades melhoradas e aplicações variadas envolvendo administração oral, ocular, nasal, anal e intravenosa, entre outras (Davis & Brewster, 2004).

A estrutura

As ciclodextrinas possuem forma de cone truncado (**Figura 7b**). Com uma cavidade demarcada por um esqueleto carbônico, átomos de hidrogênio e oxigênio que formam uma zona de alta densidade eletrônica, que caracteriza uma região hidrofóbica. A polaridade da cavidade é estimada como sendo muito similar à de uma solução aquosa de etanol. As hidroxilas secundárias ($\text{CH}_2\text{-OH}$, **Figura 7b**) estão situadas na extremidade mais estreita da molécula de CD, caracterizando uma região chamada de coroa, enquanto que na extremidade maior, chamada de borda, temos as hidroxilas primárias ($-\text{OH}$) (Loftsson & Brewster, 1996; Szejtli, 1998).

A cavidade tem caráter hidrofóbico; porém, a porção externa das CDs tem afinidade pela água o que dá a esse anel de glicoses toda sua importância podendo, assim, acoplar em seu interior substâncias não polares, ou lipossolúveis, e torná-las mais solúveis (Bibby *et al.*, 2000).

I. INTRODUÇÃO

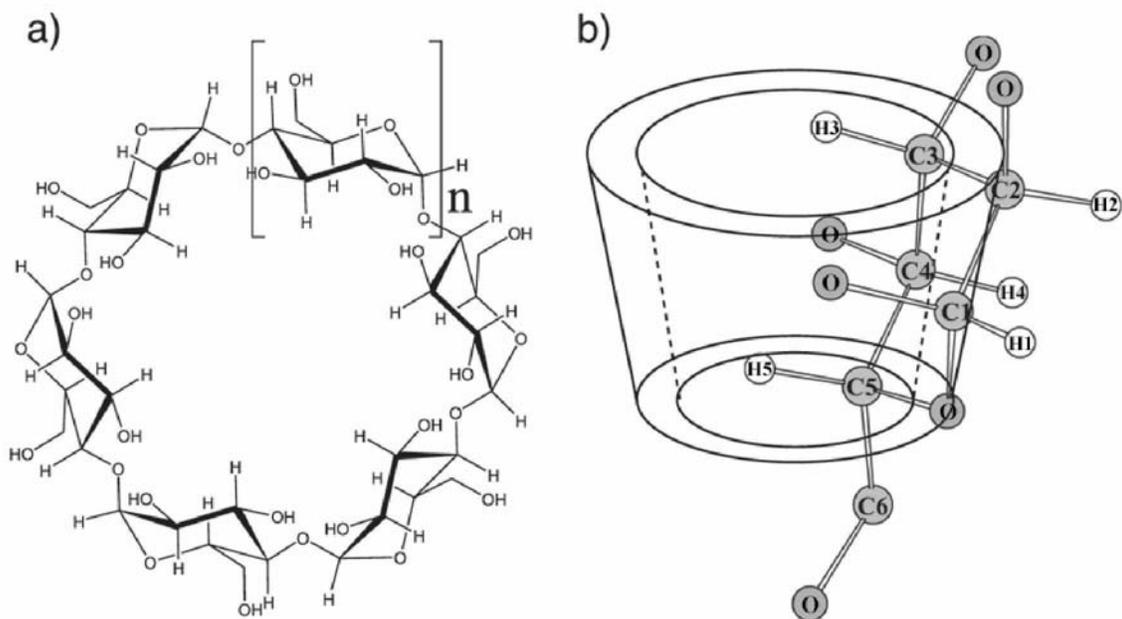


Figura 7 - (a) Estrutura geral de uma ciclodextrina, α , β e γ -CD são definidos por $n=6, 7$ e 8 , respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das ciclodextrinas (adaptado de Britto *et al.*, 2004).

A química supramolecular é uma área da química que estuda interações intermoleculares que não envolvem ligações covalentes entre as moléculas. A maioria dessas interações é do tipo hospedeiro-convidado. Dentre as moléculas hospedeiras (*hosts*) que se conhece, as ciclodextrinas são as mais importantes, pois: (1) são produtos seminaturais, provenientes de uma fonte renovável, o amido, e obtidos através de uma conversão enzimática relativamente simples; (2) são produzidas em grande escala (centenas de toneladas anuais) sem causar grandes impactos para o meio ambiente; (3) devido ao consumo e produção mundial crescentes, seus preços são aceitáveis para a produção industrial; (4) através de sua habilidade de formar complexos de inclusão, importantes propriedades das moléculas convidadas são alteradas; (5) sua toxicidade é desprezível desde que seja escolhida a ciclodextrina e a via de administração adequadas; (6) podem ser utilizadas pelo homem em preparações como excipiente em formulações medicamentosas, alimentos e cosméticos (Szejtli, 1998); (7) não desenvolvem resposta imunológica em humanos (Davis & Brewster, 2004).

A **Tabela 2** contém as propriedades das três ciclodextrinas naturais de maior abundância: α , β e γ . A solubilidade em água da β -CD é de 1,85% (m/m), é a menor dentre as

I. INTRODUÇÃO

três formas naturais mais abundantes de ciclodextrinas. Esta característica da β -CD deve-se a uma rede interna de ligações de hidrogênio envolvendo as hidroxilas secundárias e que causam precipitação da β -CD, em altas concentrações (Davis & Brewster, 2004). Substituições nos grupamentos hidroxila da β -CD geram derivados muito mais solúveis, como é o caso da hidroxipropil- β -CD, que tem as hidroxilas secundárias substituídas por radicais hidroxipropil e cuja solubilidade em água é de 60 % (m/m), isto é, mais que 600 g/L.

Outros derivados de CD como a metil, sulfobutiléter, entre outros, tem sido utilizados como carreadores de fármacos em formulações comerciais em países como os Estados Unidos, Japão e na Europa (Davis & Brewster, 2004).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais (Del Valle, 2004).

<i>Propriedade</i>	<i>α-ciclodextrina</i>	<i>β-ciclodextrina</i>	<i>γ-ciclodextrina</i>
Número de resíduos de glicose	6	7	8
Massa Molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade 25° C (% m/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura da cavidade (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

Metabolismo

As ciclodextrinas são facilmente metabolizadas bem absorvidas no trato gastro intestinal, onde interagem especificamente com alguns componentes de membrana como colesterol e alguns tipos de lipídios. Sua estrutura cíclica resiste ao meio estomacal e ao intestino delgado; porém é degradada no cólon e intestino grosso (Uekama, 2004), por bactérias da flora intestinal. Administrações intravenosas de CDs em humanos resulta em sua excreção intacta, pelos rins (Davis & Brewster, 2004). Entretanto, bactérias e fungos possuem uma amilase específica, capaz de degradar as ciclodextrinas.

I. INTRODUÇÃO

As doses tóxicas de CDs dependem da via pela qual elas são administradas. Por exemplo, a DL_{50} oral em ratos é maior que 10.000 mg/kg, enquanto a DL_{50} intravenosa está entre 500 e 750 mg/kg, para a α -CD; para a β -CD temos valores de DL_{50} oral maiores que 5.000 mg/kg e DL_{50} intravenosa entre 450 e 790 mg/kg, já a γ -CD é menos tóxica, devido a sua maior solubilidade, DL_{50} oral em ratos maior que 8.000 mg/kg e DL_{50} intravenosa de 4.000 mg/kg.

A β -CD é capaz de extrair colesterol e outros lipídios de membrana, devido à sua alta afinidade para com essas moléculas. Em concentrações suficientes a β -CD é capaz de induzir a hemólise de eritrócitos (Irie & Uekama, 1997, Pinto, 2002). Por esse motivo, sua administração intravenosa deve ser evitada. Além disso, a β -CD tem solubilidade relativamente baixa na corrente sanguínea e interage fortemente com o colesterol, levando à formação de microcristais que se depositam nos rins, causando danos aos túbulos renais. Essas características indesejáveis não são apresentadas pelos derivados da β -CD (Frank *et al.*, 1976; Frijlink *et al.*, 1990; Bekers *et al.*, 1991; Davis & Brewster, 2004).

Complexo de Inclusão

O complexo de inclusão formado entre a ciclodextrina e moléculas hóspedes é mantido por interações não covalentes e é um equilíbrio dinâmico, onde temos a molécula hóspede constantemente se associando e desassociando da cavidade da ciclodextrina (Loftsson & Brewster, 1996; Stella, *et al.*, 1999).

Em solução aquosa as ciclodextrinas naturais (α , β e γ), bem como seus derivados, acomodam moléculas de água em suas cavidades parcialmente apolares; entretanto, essa é uma interação energeticamente desfavorável, uma vez que requer uma redução da entropia das moléculas de água. Essas moléculas de água presentes na cavidade podem, então, ser substituídas por uma molécula convidada, ou parte dela, desde que aquela seja menos polar que a água (**Figura 8**). Quando há uma interação deste tipo a relação estequiométrica mais encontrada entre moléculas hóspedes e ciclodextrinas é de 1:1, sendo esta a essência da encapsulação molecular (Duchêne, *et al.*, 1999; Loftsson & Brewster, 1996; Szejtli, 1998).

I. INTRODUÇÃO

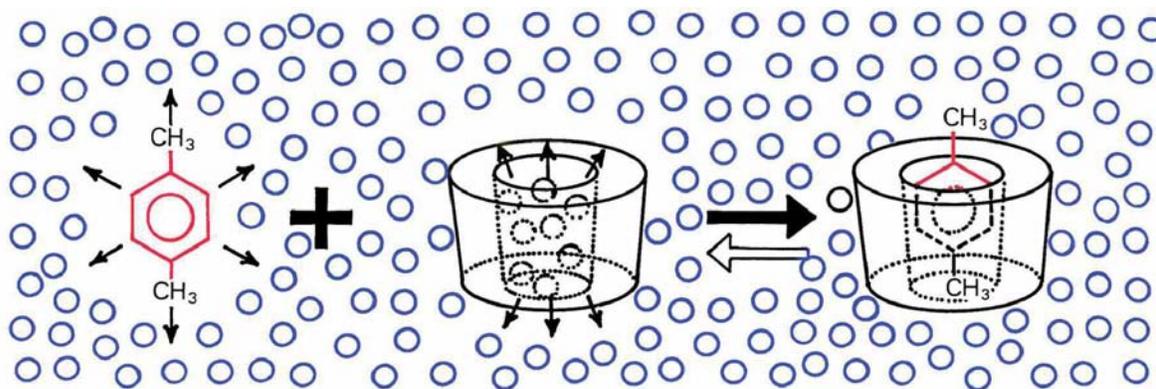


Figura 8 - Representação esquemática da associação da molécula hospedeira (CD) e convidada (*p*-xileno) (Szejtli, 1998).

Entretanto, outras possibilidades de estequiometria também são possíveis, mesmo em um único sistema, como 2:1, 2:2, 1:2 (ligante: β -CD) e outras mais complexas, como exemplificadas na **Figura 9** (Szejtli, 1998). A interação molecular pode ser avaliada por modificações nas propriedades tanto da molécula hospedeira como na molécula convidada e pode ser detectada por diversas técnicas como fluorescência, espectroscopia UV-Vis, RMN, infravermelho, entre outras. Além disso, a reatividade da molécula é alterada, sendo que na maioria dos casos a reatividade do ligante diminui, dando uma estabilidade maior para a molécula convidada.

Em geral, o complexo sólido formado fica protegido de reações químicas, exceto quando a molécula hóspede reage com as hidroxilas da CD ou quando as CDs atuam como catalisadores. A sublimação e a volatilização também são drasticamente diminuídas e a maior parte das moléculas convidadas tem sua solubilidade aumentada e formam um complexo sólido que é facilmente dissolvido e rapidamente solubilizado (Loftsson & Brewster, 1996; Stella, *et al.*, 1999).

Estudos mostram que mais de 40 % dos insucessos no desenvolvimento de novos fármacos são causados por limitações nas características farmacotécnicas dos mesmos, como baixa capacidade de dissolução e permeabilidade (Davis & Brewster, 2004). A capacidade das ciclodextrinas de modificar a taxa de liberação de inúmeras moléculas de baixa solubilidade em água possibilita que as mesmas sejam utilizadas para aumentar a absorção de fármacos através de barreiras biológicas, isto é, como carreadores, em formulações de liberação imediata, por exemplo (Uekama, 2004).

I. INTRODUÇÃO

Entretanto há casos em que a ciclodextrina funciona como um catalisador artificial, acelerando reações ou como ferramenta de separação de moléculas (Szejtli, 1998). De fato o grupo da Dra. V. Scarpa mostrou que o complexo de inclusão hidroquinona/ β -CD acelera a oxidação do ligante, impedindo sua utilização como fotoprotetor (Boldrini, 2005). Schneiderman & Stalcup (2000), em uma revisão sobre o uso de ciclodextrinas na separação de moléculas, destacam a capacidade das mesmas em distinguir isômeros, grupos funcionais, homólogos e enantiômeros mostrando, assim, a versatilidade e a empregabilidade das ciclodextrinas nesse ramo.

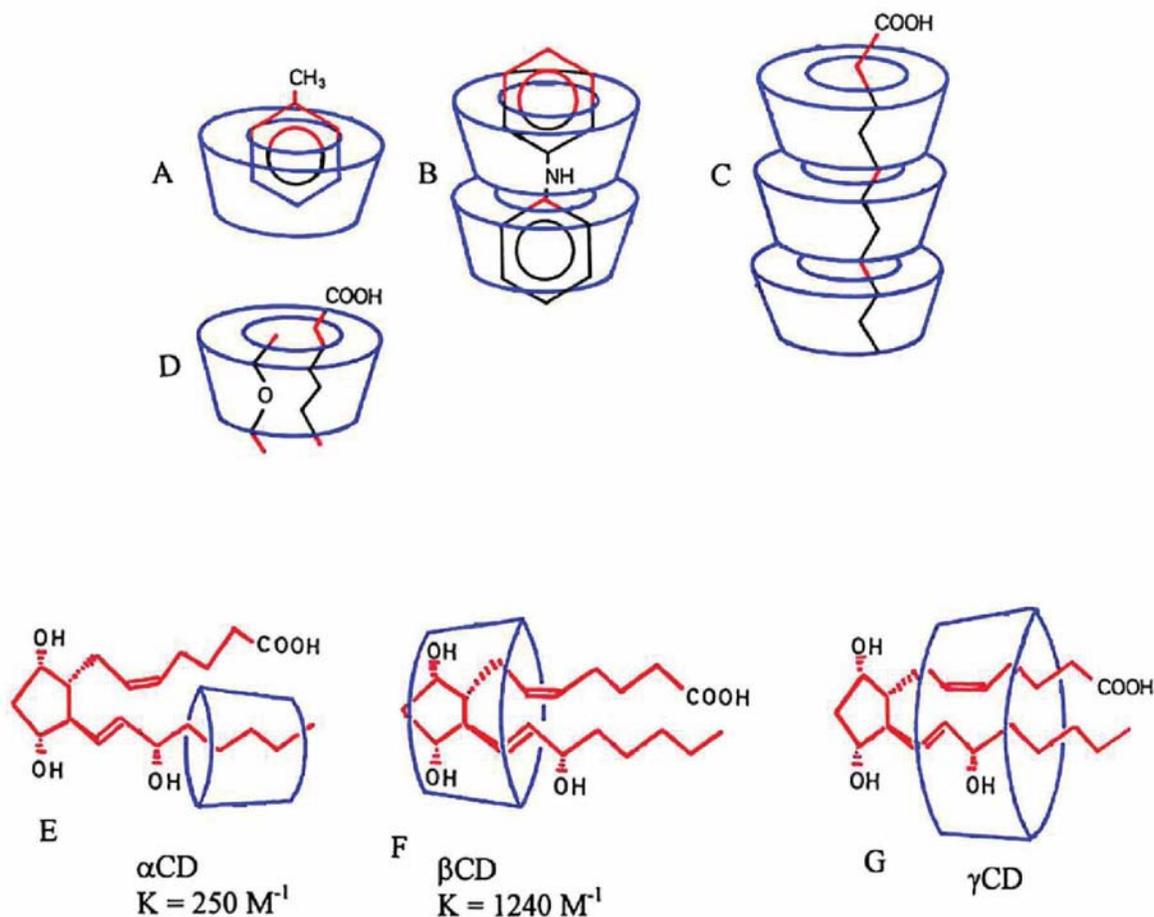


Figura 9 - Exemplos de estequimétricas para complexos de inclusão: A) Tolueno/ β -CD (1:1), B) difenilamina/ β -CD (1:2), C) ácido graxo de cadeia longa/ β -CD (1:3), D) complexo ácido graxo de cadeia curta + dietil éter/ β -CD (2:1) e diferentes formas de interação entre α (E), β (F) e γ -CD (G) com a prostaglandina E2.

I. INTRODUÇÃO

Mercado

Os estudos com ciclodextrinas levaram ao desenvolvimento de produtos comerciais em diversas áreas como: alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. No Japão, desde 1978 as CDs são legalmente permitidas em formulações comerciais. Na **Tabela 3** temos uma lista de formulações farmacêuticas à base de ciclodextrinas que tem sua comercialização autorizada, em diferentes países do mundo (Davis & Brewster, 2004). No Brasil o Decreto nº 3.803, de 24 de Abril de 2001 regulamentou o uso de uma formulação do piroxicam/ β -CD, um antiinflamatório de administração oral.

A baixa toxicidade apresentada pelas CDs é um atributo importante que permite diversas aplicações para as CDs como carreadores de fármacos, alimentos, aromas e cosméticos (Singh *et al.*, 2002).

Tabela 3 - Produtos contendo β -ciclodextrina aprovados e no mercado em vários países do mundo, (adaptado de Davis & Brewster, 2004).

<i>Fármaco</i>	<i>Via de Administração</i>	<i>Nome comercial</i>	<i>País</i>
Benexate	Oral	Ulgut, Lonmiel	Japão
Dexamethasone	Dérmica	Glymesason	Japão
Iodo	Tópica	Mena-Gargle	Japão
Nicotina	Sublingual	Nicorette	Europa
Nimesulida	Oral	Nimedex, Mesulid	Europa
Nitroglicerina	Sublingual	Nitropen	Japão
Omeprazole	Oral	Omebeta	Europa
Dinoprostone (PGE2)	Sublingual	Prostarmon E	Japão
Piroxicam	Oral	Brexin e Cicladol	Europa e Brasil
Ácido Tiaprofênico	Oral	Surgamyl	Europa

I. INTRODUÇÃO

Futuro

Novas aplicações para o uso de ciclodextrinas são relatadas com frequência. Em 1999, por exemplo, iniciaram-se pesquisas utilizando as CDs como carreadores de genes. Desde então numerosos polímeros contendo CDs vem sendo utilizados para este fim; polications contendo CDs apresentam a vantagem de serem menos tóxicos em testes *in vitro* e *in vivo* quando comparados a outros veículos convencionais, como a poli-l-lisina e polietilenoimina (Davis & Brewster, 2004).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo inicial a **preparação** de um complexo de inclusão entre praziquantel e β -ciclodextrina (PZQ/ β -CD). A interação com β -CD foi planejada visando aumentar a solubilidade do praziquantel em água tornando-o, assim, mais biodisponível. Foi realizada a **caracterização físico-química** do complexo PZQ/ β -CD por diferentes metodologias e a **avaliação do efeito farmacológico** do mesmo, em comparação ao PZQ livre foi realizado através de testes de citotoxicidade *in vitro* e testes de atividade esquistossomicida *in vivo*, em camundongos infectados com *S. mansoni*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PREPARAÇÃO DO COMPLEXO SÓLIDO PZQ/ β -CD

O complexo sólido foi obtido através da mistura do Praziquantel (doação da Merck KGaA, Darmstadt, Germany, lote nº: F729322) com β -Ciclodextrina (Sigma, St. Louis, USA), em proporções apropriadas, utilizando-se o protocolo adaptado de de Azevedo e colaboradores (2000a, b). Este protocolo propõe a solubilização do fármaco em um solvente orgânico apropriado. Para o PZQ foi utilizada acetona e para a β -CD água. As soluções foram misturadas e levadas a um evaporador rotativo (TE 120 Tecnal) até que todo o solvente fosse volatilizado. A amostra foi ressuspensa em água e liofilizada (Liofilizador LABCONCO Freezone 4.5), para obtenção do complexo sólido, que foi estocado em freezer (-15 °C).

Foram preparados complexos sólidos em duas estequiometrias (1:1 e 1:2 de PZQ/ β -CD), variando a proporção molar de β -CD em relação à de PZQ (de Jesus *et al.*, 2004).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS SÓLIDOS DE PZQ/ β -CD

3.2.1. MODELAGEM MOLECULAR

O complexo de inclusão molecular *host-guest* descrito para as ciclodextrinas é formado por interações não covalentes e tem sido objeto de estudo em diversas áreas do conhecimento como química supramolecular, biologia e farmácia (Barbic *et al.*, 2000). Quando uma molécula *guest* (convidada) se aproxima de uma molécula hospedeira (*host*) e essa interação leva a um abaixamento da energia do sistema isto é uma indicação de que um complexo de inclusão estável pode ser formado, a menos que uma barreira energética impeça o processo de se concretizar (Barbic *et al.*, 2000).

Foram realizados cálculos de modelagem molecular com o intuito de avaliar, termodinamicamente, a viabilidade de formação do complexo de inclusão PZQ/ β -CD e, além disso, prever o tipo de incorporação mais provável para estas moléculas. Valores de entalpia (ΔH) e a diferença energética entre as moléculas livres e ligadas ($E_{\text{Afinidade}}$) obtidos

III. MATERIAL E MÉTODOS

para cada tipo de incorporação testada em diferentes estequiometrias (1:1 e 1:2), foram comparados a fim de se encontrar o complexo mais estável.

Os cálculos de Mecânica Molecular realizados são relativamente simples, porém permitem o estudo de sistemas contendo ciclodextrinas em pouco tempo, além de poderem ser realizados em computadores pessoais, o que resulta em cálculos computacionais baratos e práticos (Jursic *et al.*, 1996).

Para a otimização do complexo de inclusão estudado utilizamos os programas de modelagem HyperChem 6.03v e MacroModel/Maestro 7.3. Os cálculos foram executados em métodos semi-empíricos (AM1) ou com o formalismo da Mecânica Molecular (MM).

Utilizamos os campos de força AM1 para o HyperChem e MM2 para o MacroModel. O primeiro, menos poderoso, consiste num programa para PC que permite cálculos iniciais das conformações de energia mínima de moléculas em métodos semi-empírico AM1, de forma adequada à representação espacial da β -CD, de acordo com os dados de literatura (Lino *et al.*, 1999; Balabai *et al.*, 1998). O campo de força MM2 se mostrou muito aceitável para o estudo de complexos de inclusão contendo ciclodextrinas, como demonstraram Cervelló e colaboradores (2000). Para incluir o efeito do solvente foi utilizado o protocolo *Generalized Bohr Surface Area* (GB/SA) pois o solvente desempenha um importante papel no processo de formação do complexo. Além disso usamos o gradiente *Block-Diagonal Newton-Raphson*, e rms (*root mean square*) de $0,01 \text{ kcal } \text{Å}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Cervelló *et al.*, 2000).

Para a realização dos cálculos, a molécula de PZQ foi posicionada na cavidade da β -CD em diferentes orientações. Selecionamos o centro de massa do anel isoquinolínico para a orientação da molécula e atribuímos a nomenclatura “isoquinolínico dentro” ou “isoquinolínico fora”, para descrever a orientação do anel isoquinolínico do PZQ dentro e fora da cavidade da ciclodextrina (**Figura 12A, B e C, D**), respectivamente. Para identificar a orientação da β -CD utilizamos a denominação borda e coroa, para sua cavidade maior e menor, respectivamente, como descrito no item 1.2.1 - Introdução.

Foram testadas duas estequiometrias: 1:1 e 1:2 que podem ser visualizadas na **Figura 12** e **Figura 13**. Na razão molar de 1:1 tínhamos quatro possibilidades: o PZQ poderia interagir com uma de suas duas regiões (o anel isoquinolínico ou o ciclohexano) com as extremidades borda ou coroa da β -CD. Na razão molar 1:2 foram previstas três formas de interação: uma onde as bordas das duas ciclodextrinas estariam voltadas para si e outra onde

III. MATERIAL E MÉTODOS

as coroas estariam interagindo (ambas com o PZQ inserido internamente) e, finalmente, a terceira em que o PZQ aloca-se entre duas β -CD que interagem de forma desigual, isto é, uma com a borda outra com as coroas voltadas para o PZQ. Uma quarta possibilidade, de interação desigual seria possível (coroa:borda), entretanto, testes iniciais não mostraram haver diferenças entre a terceira (previamente descrita) e quarta possibilidades, a qual foi, então, desconsiderada.

Este trabalho foi desenvolvido junto ao Instituto de Química da Unicamp, com o auxílio do Prof. Dr. Yuji Takahata e do Dr. Antonio Carlos Senges Lino.

3.2.2. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

O experimento com calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizado num calorímetro Universal V2.3D TA Instruments, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. Amostras de 10 mg foram aquecidas a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min, numa faixa de 30-200 °C.

3.2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise morfológica do complexo de inclusão PZQ/ β -CD (1:1 e 1:2) foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio de varredura JEOL JSM – T300 pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia – UNICAMP.

Amostras de PZQ, β -CD, complexos de inclusão PZQ/ β -CD e misturas físicas PZQ/ β -CD (1:1 e 1:2) foram montadas em *stubs* de alumínio, usando fita dupla face e cobertas com ouro sob vácuo por 180 s, para tornarem-se eletricamente condutivas. Amostras do PZQ e da β -CD foram submetidas, separadamente, ao processo de formação do complexo e também foram analisadas pela MEV.

3.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DO PZQ EM ÁGUA

O PZQ apresenta um pico de absorção em 270 nm. Para a determinação do coeficiente de absorvidade molar do PZQ nesse comprimento de onda foram preparadas soluções com concentrações crescentes (0,1 a 0,6 mM) de PZQ em temperatura controlada ($25^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$),

III. MATERIAL E MÉTODOS

com o cuidado para que a concentração máxima fosse menor que o limite de solubilidade aquosa do fármaco. As amostras foram centrifugadas a 850 xg por 5 min. em aparelho Sorvall MC 12 V (Du Pont) e posteriormente filtradas em um filtro MillexGP, 0,22 μm (Millipore Carrighwohill, County Cork, Ireland) para evitar que possíveis cristais do fármaco interferissem na leitura do sobrenadante. A concentração do fármaco foi determinada com leituras da absorbância ($\lambda = 270 \text{ nm}$). Foi construído um gráfico dos valores de absorção em função da concentração de PZQ, a partir do qual foi determinado o coeficiente de absortividade molar (ϵ) do PZQ em água.

3.2.5. ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE

A mensuração das isotermas de solubilidade de um composto na presença de seu ligante foi proposta por Higuchi & Connors em 1965; ela consiste em um experimento onde concentrações crescentes de um ligante (L) – no caso a ciclodextrina ou molécula hospedeira – são adicionados a diferentes soluções saturadas de uma substância de interesse, o soluto (S) – que é aqui representado pelo PZQ ou molécula convidada. Com isso é possível construir um gráfico da concentração de S solubilizado em função de L, que tem sua concentração aumentada de 0 (zero), até o limite de solubilidade de L. Essas amostras são deixadas sob agitação e temperatura constante até atingirem o equilíbrio quando, então, determina-se a concentração de S em cada solução (Higuchi & Connors, 1965).

A concentração do PZQ foi fixada em 8 mM e a β -CD teve suas concentrações variadas de 0 até 16 mM, que corresponde a solubilidade aquosa da mesma (Frömming & Szejtli, 1994; Davis & Brewster, 2004). Foram preparadas soluções de 20 mL de volume total que foram deixadas sob agitação de 60 oscilações por minuto, em temperatura controlada ($25^\circ \pm 0,5^\circ \text{ C}$), durante 7 dias (Becket *et al.*, 1999). Diariamente alíquotas de 1 mL eram retiradas, centrifugadas a 850 xg por 5 min. em um aparelho Sorvall MC 12 V (Du Pont), filtradas em um filtro MillexGP de 0,22 μm (Millipore Carrighwohill, County Cork, Ireland) e tinham a concentração do PZQ avaliada pela leitura das absorbâncias em 270 nm. Após a análise as amostras eram retornadas às soluções de origem. Os testes foram realizados em triplicata.

Através dos resultados obtidos no estado de equilíbrio foi possível determinar a K_a (constante de associação) entre o ligante (β -CD) e o soluto (PZQ). Entretanto, a

III. MATERIAL E MÉTODOS

determinação de K_a do complexo só é possível quando a estequiometria da reação é conhecida (Higuchi & Connors, 1965). Para os complexos de associação com estequiometria 1:1 é possível o cálculo de K_a utilizando a equação abaixo:



$$K_a = \frac{[SL]}{[S][L]}$$

Experimentalmente K_a pode ser determinado diretamente dos gráficos resultantes da solubilidade na presença do ligante, de acordo com a **Equação 2** (Higuchi & Connors, 1965; Frömmling & Szejtli, 1994):

$$K_{1:1} = \frac{\text{inclinação}}{S_0 (1 - \text{inclinação})} \quad 2$$

onde S_0 corresponde à solubilidade do soluto na ausência do ligante.

Para estequiometrias diferentes de 1:1, K_a pode ser determinada, usando-se equações adequadas à descrição de interação (Frömmling & Szejtli, 1994).

As isotermas de solubilidade podem ser classificadas em dois tipos básicos, do tipo A, quando o complexo formado é solúvel e tipo B, quando o complexo formado possui uma solubilidade limitada e torna-se insolúvel a partir de determinadas concentrações de L, como mostra a **Figura 10**. O tipo A pode ser ainda subdividido em outros três tipos: A_L , onde a solubilidade do soluto aumenta linearmente com a concentração de ciclodextrina e A_P e A_N , onde há um desvio positivo e um negativo, respectivamente. Quando o complexo de inclusão é solúvel e formado na estequiometria 1:1 será caracterizado por uma isoterma do tipo A_L , porém quando mais de uma molécula de ciclodextrina está envolvida na formação do complexo solúvel temos um complexo do tipo A_P . O mecanismo de interação do tipo A_N é um pouco mais complicado, porque há uma contribuição significativa da interação soluto-solvente no processo de formação do complexo de inclusão. O subtipo B_S , onde inicialmente há um aumento da solubilidade do soluto, seguido de um platô e posterior diminuição da

III. MATERIAL E MÉTODOS

solubilidade em altas concentrações de ciclodextrina, geralmente é causado por uma precipitação microcristalina do complexo. O subtipo B_I é característico de complexos de inclusão insolúveis em água (Higuchi & Connors, 1965; Frömming & Szejtli, 1994; Uekama *et al.*, 1998).

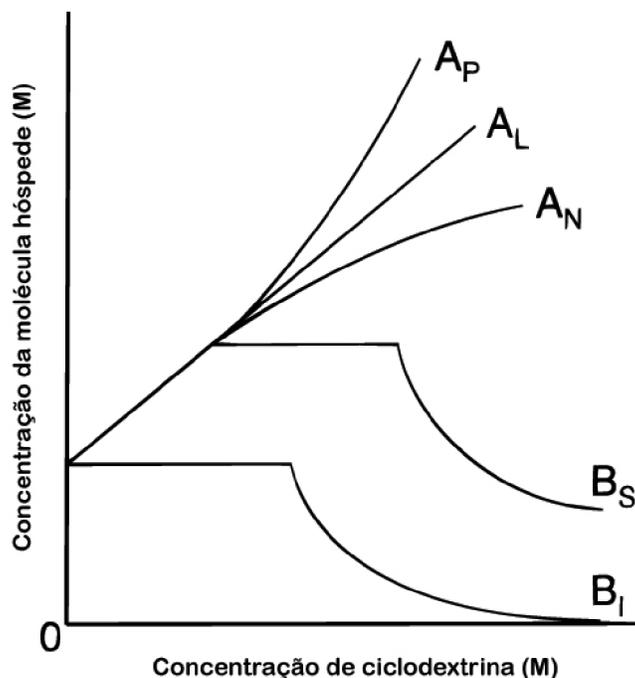


Figura 10 - Tipos de isothermas de solubilidade, de acordo com Frömming & Szejtli, 1994.

3.2.6. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

3.2.6.1. FUNDAMENTO TEÓRICO

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é, reconhecidamente, uma das técnicas mais importantes para a investigação em nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica em diversos estados da matéria e em particular é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas em solução. A RMN ocupa, igualmente, um lugar de destaque no campo da análise quali e quantitativa, de componentes em produtos alimentares, em fluidos biológicos e metabólicos em tecidos e órgãos de seres vivos intactos, de modo não invasivo e não destrutivo.

Em condições apropriadas e sob um campo magnético, as transições nucleares de uma dada amostra podem ser registradas pela absorção de radiação eletromagnética, na faixa de radiofrequência (MHz) de acordo com:

$$h \cdot \nu = \mu \cdot B_0$$

onde: h =constante de Planck; ν =frequência (MHz); μ =momento magnético nuclear e B_0 =campo magnético (Tesla).

Numa mesma molécula, há valores de μ diferentes para cada núcleo, o que permite a observação de espectros de RMN de elementos que tenham número atômico ou de massa ímpar ($\mu \neq 0$) ou os dois. Os núcleos mais comuns utilizados em RMN são: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{31}P . Esses núcleos atômicos apresentam uma propriedade chamada de spin nuclear, onde os núcleos comportam-se como se estivessem girando. De fato o núcleo que possui ou massa molar ou número atômico ímpar, ou ambos, tem momento angular de spin quantizado e um momento magnético. Para cada núcleo com spin, o número de estados permitido é quantizado e determinado pelo número quântico de spin nuclear (I). Para cada núcleo, o número I é uma constante física, e os estados permitidos são $2I + 1$ (Pavia *et al.*, 1996).

Na ausência de um campo magnético externo, todos os estados de spin de um dado núcleo são equivalentes em energia e em um conjunto de núcleos, todos os estados de spin deveriam estar igualmente distribuídos na população, com igual número de núcleos em cada um dos estados de spin permitidos (Pavia *et al.*, 1996). Porém, quando um campo magnético é aplicado, o núcleo desenvolve uma precessão sobre seu próprio eixo com uma frequência angular, ω , que também é conhecida como frequência de Larmor. A frequência com a qual o núcleo desenvolve a precessão é diretamente proporcional ao campo de força aplicado (Pavia *et al.*, 1996).

Como o núcleo possui momento magnético, a precessão gera um campo elétrico oscilante de mesma frequência. Se ondas de radiofrequência com essa mesma frequência são fornecidas, o núcleo pode então absorver essa energia. Isto é, quando a frequência da componente do campo elétrico oscilante se iguala a frequência do campo elétrico gerado pela precessão do núcleo (ω) os dois campos se igualam, e a energia pode ser transferida para o núcleo, levando este a uma mudança de spin. Essa condição é chamada de **ressonância**, e diz-se que o núcleo está em ressonância com a onda eletromagnética de entrada (Pavia *et al.*, 1996).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Num experimento de RMN busca-se registrar a absorção de energia que ocorre na condução de ressonância, aplicando-se a frequência da radiação apropriada numa amostra sob campo magnético externo. Após a radiação simultânea de todos os núcleos o decaimento do sinal de absorção (*free induction decay* - FID) é registrado e armazenado no espectrômetro. Em seguida os sinais digitais são registrados em função do tempo são transformados para o domínio da frequência, utilizando a transformada de Fourier. Nisto se constitui o espectro de RMN, em que os picos de absorção são decompostos (de um domínio de tempo) e mostrados num gráfico de frequência por intensidade dos picos (Derome, 1987).

A ocorrência de sinais em diferentes valores de frequência para um mesmo núcleo (por exemplo, ^1H) é uma indicação de que o campo magnético experimentado por cada núcleo numa mesma molécula depende do ambiente químico em que ele está inserido (Gil & Geraldese, 1987). A diferença na frequência de absorção de um núcleo em particular em relação a um núcleo usado como referência é chamada de deslocamento químico (Silverstein *et al.*, 1991) e é expressa em ppm (partes por milhão da frequência, em Hz). O valor do deslocamento químico permite identificar os diferentes átomos do núcleo em questão, dentro de uma molécula. Isso acontece pois os hidrogênios de uma mesma molécula estão rodeados por elétrons, o que gera uma suave diferença entre o ambiente eletrônico que envolve os núcleos. Assim como os prótons, os elétrons são partículas que possuem carga portanto, quando em movimento tem a capacidade de gerar um campo magnético. A densidade eletrônica da camada de valência varia de um núcleo para outro e os núcleos são blindados pelo campo gerado pelos elétrons que os rodeiam, pois a circulação dos elétrons da camada de valência do átomo, chamada de corrente diamagnética local, gera um campo de força contrário ao campo magnético aplicado (B_0) (Pavia *et al.*, 1996).

Além dos deslocamentos químicos, outras informações importantes num espectro de RMN são: 1) a constante de acoplamento (J), que é o desdobramento da absorção de um núcleo ou grupo de núcleos em mais de um pico devido a interação com o momento magnético de núcleos adjacentes e 2) o tempo de relaxação nuclear, que é a medida do tempo que o núcleo demora a retornar de seu estado excitado depois de ter absorvido a radiofrequência (Derome, 1987; Silverstein *et al.*, 1991).

Através da RMN também é possível obter informações sobre a proximidade espacial entre núcleos de uma mesma molécula ou de moléculas distintas e para isso utiliza-se a

III. MATERIAL E MÉTODOS

medida do Efeito Overhauser Nuclear (NOE). Este efeito é observado quando saturamos um determinado sinal de absorção de energia, os núcleos que interagem espacialmente com o spin nuclear saturado sofreram alterações de intensidade em seus picos, proporcionais à proximidade espacial com o núcleo saturado (Gil & Geraldês, 1987).

Técnicas avançadas de RMN, incluindo seqüências de pulso complexas e espectros multidimensionais constituem, atualmente, as ferramentas mais potentes para determinar a conformação tridimensional de moléculas em solução (Ernst *et al.*, 1986; Günther, 1994). Estas técnicas permitiram determinar, com resolução atômica, a proximidade entre núcleos da molécula de β -CD e do PZQ, esclarecendo, assim, a estequiometria e a geometria espacial do complexo de inclusão formado.

3.2.6.2. MEDIDAS UNI E BIDIMENSIONAIS DE RMN

As amostras de PZQ e β -CD foram preparadas a 1 mM, em D₂O. Alíquotas de 600 μ L foram levadas ao espectrômetro em tubos de 5 mm de diâmetro. Os experimentos foram conduzidos a 20 °C e o pico da água residual foi utilizado como referência sendo ajustada em 4,87 ppm. Os experimentos monodimensionais de RMN de hidrogênio (¹H-RMN, DOSY) e bidimensionais (COSY e C-HSQC) foram conduzidos no espectrômetro Varian INOVA 500 (operando em um campo de 9,24 Tesla em uma frequência para hidrogênio de 499,73 MHz e 125,686 MHz para carbono), pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em colaboração com Dr. Leonardo F. Fraceto e a Dra. Telma A. Pertinhez.

O experimento COSY (*Correlation Spectroscopy*) fornece um espectro bidimensional, onde é possível observar correlações escalares entre os hidrogênios que estão acoplados (¹H-¹H). Estes acoplamentos podem ser observados em picos que aparecem fora da diagonal (*cross-peaks*) e, geralmente, todos os acoplamentos (¹H-¹H) são detectados por essa técnica. Os acoplamentos observados são aqueles referentes a duas ou três ligações de hidrogênios geminais e vicinais (²J, ³J) podendo, ainda, atingir até quatro ligações químicas. Os experimentos COSY foram realizados utilizando uma janela de 8000 Hz, com número de scans de 64 e número de incrementos na segunda dimensão de 256.

No experimento C-HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) observa-se a correlação entre o ¹³C-¹H, permitindo identificar quais hidrogênios estão ligados a cada carbono numa mesma molécula. Os experimentos de C-HSQC foram realizados utilizando

III. MATERIAL E MÉTODOS

janelas de 8000 Hz para hidrogênio e 17000 Hz para carbono, número de scans de 64 e número de incrementos na segunda dimensão de 256.

Assim como acontece em acoplamentos heteronucleares, onde a irradiação de um hidrogênio ligado a um carbono causa um aumento no sinal do ^{13}C diretamente ligado a ele, o efeito Overhauser nuclear também é observado em hidrogênios, que apesar de não estarem acoplados de maneira escalar, possuem uma proximidade espacial com outros átomos. Entretanto, esse efeito é notado apenas em pequenas distâncias e com menor intensidade e é decorrente da relaxação nuclear via interação dipolar, através do espaço.

Em um espectro de NOE bidimensional (NOESY) reunimos todos os efeitos NOE ^1H - ^1H de dada molécula em apenas um espectro, que se assemelha ao espectro de COSY. É obtido, então, um espectro bidimensional onde os picos de ^1H correspondentes às interações escalares são representados por contornos ao longo da diagonal e todos os picos encontrados fora dela correspondem às interações ^1H - ^1H via espaço (Silverstein *et al.*, 1991). A medida das coordenadas giratórias com trava de spin (ROESY) representa uma melhoria do NOESY onde a difusão de spins via escalar é diminuída, melhorando assim a qualidade das informações de NOE obtidas (Kuroda & Kitamura, 1984).

3.2.6.3. DIFUSÃO MOLECULAR COM GRADIENTE DE CAMPO: DOSY

A difusão molecular consiste nos movimentos aleatórios (brownianos) das moléculas, que dependem basicamente do tamanho da molécula (seu raio hidrodinâmico), da resistência que o meio oferece à difusão (viscosidade do meio) e da temperatura do sistema. O coeficiente de difusão molecular pode ser descrito através da equação abaixo:

$$D = \frac{kT}{6\eta\pi r} \quad 4$$

onde: D é o coeficiente de difusão (m^2s^{-1}), k é a constante de Boltzman ($1,3806 \times 10^{-23}$ J), T é a temperatura (K), η é a viscosidade do meio (Pas) e r é o raio hidrodinâmico da molécula (Wimmer *et al.*, 2002).

O coeficiente de difusão fornece importantes informações sobre a organização molecular. Ele é um parâmetro microscópico que revela diversos processos macroscópicos

III. MATERIAL E MÉTODOS

que estão ocorrendo no meio líquido, entre as quais: colisões moleculares, interações soluto-solvente, interações soluto-soluto, etc. Assim, pela variação do coeficiente de difusão podemos acompanhar modificações tanto estruturais como fenômenos relacionados a ligações e interações moleculares, em sistemas coloidais ou macromoleculares em solução (de Souza & Laverde Jr., 2002).

A metodologia de espectroscopia ordenada por difusão (DOSY) foi desenvolvida por Morris e Johnson, em 1992. Na seqüência de pulsos BPPSTE (*bipolar pulse pairs stimulated echo*) assume-se que os núcleos apesar de estarem distribuídos por toda a amostra estão, teoricamente, sofrendo a ação do mesmo campo magnético; de igual forma assume-se que os spins nucleares estão precessando, sob um campo magnético, a uma frequência definida por suas características intrínsecas e seu ambiente eletrônico local. O experimento consiste em manipular os campos locais com o auxílio de pulsos de gradiente de campo magnético, para que as posições espaciais dos núcleos possam ser codificadas (Morris & Johnson, 1992).

Dentre as aplicações da técnica DOSY a quantificação de partição ou interação de soluto e compostos macromoleculares foi utilizada para estudar o fenômeno de inclusão molecular do PZQ e da β -CD, através da medida dos coeficientes de difusão (de Souza & Laverde Jr., 2002). Sabendo que há interações químicas entre o PZQ e a β -CD, o coeficiente de difusão observado ($D_{\text{observada}}$) refletirá os coeficientes de difusão das populações do PZQ (livre e ligado) e da β -CD, como mostra a **Equação 5**:

$$D_{\text{observada}} = f_{\text{ligada}} D_{\text{ligada}} + f_{\text{livre}} D_{\text{livre}} \quad 5$$

onde: $D_{\text{observada}}$ é o coeficiente de difusão em presença de β -CD, D_{ligada} é o coeficiente de difusão do PZQ ligado a β -CD, D_{livre} é o coeficiente de difusão do PZQ em solução, f_{ligada} é a fração de PZQ ligada a β -CD e f_{livre} é a fração de PZQ em solução.

Assumindo que a troca ocorra entre um estado livre e ligado a β -CD, a fração do ligante em quaisquer dos estados, livre ou ligado, é representada por f_{livre} e f_{ligada} . Desta forma podemos obter a constante de associação aparente (K_{ap}) da fração ligada (f_{ligada}) através das **Equações 6 e 7** (Wimmer *et al.*, 2002):

$$f_{\text{ligada}} = (D_{\text{observada}} - D_{\text{livre}})/(D_{\text{ligada}} - D_{\text{livre}}) \quad 6$$

$$K_{\text{ap}} = f_{\text{ligada}}/(1 - f_{\text{ligada}})([S] - f_{\text{ligada}} [L]) \quad 7$$

onde: K_{ap} é a constante de associação, [S] e [L] são as concentrações do soluto (PZQ) e do ligante (β -CD), respectivamente.

Os experimentos de DOSY foram realizados com a seqüência de pulso BPPSTE, descrita por Johnson Jr. (1999). A duração da codificação da fase de difusão total do gradiente de pulso foi de 0,002 segundos, *diffusion delay* foi de 0,05 segundos e a força mínima de gradiente foi ajustada para 0,3 Gauss/cm. Os coeficientes de difusão foram obtidos na ausência e na presença de β -CD (na razão molar de 1:1).

3.2.7. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE: CULTURA DE CÉLULAS

Diferentes ensaios têm sido usados para analisar a citotoxicidade *in vitro* de fármacos, incluindo a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bifenil tetrazolium (MTT), incorporação do vermelho neutro e avaliação do conteúdo de ácidos nucléicos. O teste de redução do MTT indica a função mitocondrial, baseado na redução enzimática do sal brometo de tetrazólio catalisada por desidrogenases mitocondriais das células viáveis (Corrêa *et al.*, 2005).

Células de fibroblastos V79, de pulmão de hamster chinês foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco), contendo antibióticos (100 U/mL de penicilina G e 100 μ g/mL de estreptomicina) e suplementadas com 10 % de soro fetal bovino, em uma atmosfera umidecida com 5 % de CO₂, a 37 °C.

Para os ensaios de viabilidade celular foram utilizadas placas de 96 (8 x 12) poços de cultura de células, inoculadas com 3. 10⁴ células/mL, a 37 °C e cultivadas por 24 h até que as culturas se tornassem semi-confluentes. Após esse período o meio foi substituído por outro meio contendo as diferentes concentrações de PZQ, β -CD e complexos de inclusão (PZQ/ β -CD) na estequiometria 1:1 e 1:2.

O primeiro poço da placa (A1), contendo apenas água foi utilizado para calibrar a leitura de absorbância do aparelho, os demais poços da primeira coluna foram utilizados

III. MATERIAL E MÉTODOS

como controle, contendo apenas o meio de cultura e as células. As demais colunas eram utilizadas, cada uma para o teste de uma concentração diferente de tratamento (PZQ e complexos de inclusão), em octuplicata.

As células foram, então, incubadas por mais 24 h, após as quais o teste da redução do brometo de MTT foi realizado.

3.3. TESTES *IN VIVO*

3.3.1. TESTES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. MANSONI*

Foram utilizados camundongos fêmeas (*Mus musculus*), Swiss, SPF, com 30 dias e pesando cerca de 20 g. Os animais provenientes do CEMIB, Centro de Bioterismo da UNICAMP, foram alojados coletivamente (10 animais por gaiola) e submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas com água e alimentação *ad libitum* e com temperatura ambiente monitorada a 22 ± 3 °C.

Para infecção foram utilizadas cercárias provenientes de diversos moluscos, para evitar uma infecção unissexual. Os moluscos foram expostos à luz por uma hora para que houvesse a liberação das cercárias. A infecção dos camundongos foi realizada com a técnica de imersão da cauda, utilizando para cada animal uma suspensão contendo 70 cercárias, durante 2 horas de exposição à luz artificial, a uma temperatura aproximada de 28 °C proporcionada por lâmpadas incandescentes de 60 W, para estimular a atividade penetrante das cercárias (Oliver & Stirewalt, 1952). A mortalidade dos animais foi analisada diariamente. Após 56 dias os animais foram pesados e os tratamentos foram administrados por tubagem gástrica, como mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Tratamento dos animais infectados.

<i>Grupos</i>	<i>Dose</i>	<i>n</i>	<i>n° de cercárias por camundongo</i>
1) Controle Positivo (salina)	0,3 mL	15	70
2) Controle Negativo (β-CD)	635 mg/kg	15	70
3) Praziquantel	175 mg/kg	20	70
4) Complexo Sólido (1:1)	810 mg/kg	20	70

III. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram utilizados 15 animais em cada grupo. Entretanto, para que fosse possível identificar a diferença entre os grupos do PZQ e do complexo PZQ/ β -CD foi necessário aumentar de 15 para 20 o número de animais por grupo.

A dose efetiva de PZQ foi estabelecida a partir de resultados descritos na literatura, em camundongos administração única de PZQ de 350 mg/kg (Arena, 1997; Xiao *et al.*, 1985). Decidimos, então, utilizar a metade desta dose, com o intuito de observar um efeito sub máximo da droga e notar possíveis diferenças entre o PZQ livre e o complexo de inclusão e também avaliar se o complexo PZQ/ β -CD permitia uma diminuição da quantidade de PZQ administrado para desempenhar sua função esquistossomicida.

Estes testes foram realizados apenas com o complexo sólido, na estequiometria de 1:1, e a dose foi calculada para que a mesma quantidade de PZQ fosse administrada tanto no grupo 3 quanto no grupo 4 (**Tabela 4**). Assim, devido ao alto peso molecular da β -CD, necessitamos de uma dose aparentemente alta, 810 mg/kg, para conter as mesmas 175 mg/kg de PZQ no complexo. Todas as doses foram calculadas e ressuspendidas em água de forma que o volume administrado não ultrapassasse 1 % do peso do animal.

Decorridos 71 dias de infecção realizou-se a perfusão do sistema porta-hepática de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* da cepa BH. Os animais foram mortos por deslocamento cervical e posteriormente submetidos à perfusão do sistema porta hepático utilizando a metodologia descrita por Yolles e col. (1947) para a recuperação dos esquistossomos. Após a perfusão e extração dos vermes do fígado, este foi esmagado entre duas placas de vidro (Hill, 1956) para a coleta de possíveis vermes remanescentes não extraídos durante a perfusão. Em seguida foram analisadas as veias mesentéricas. Os vermes foram examinados sob lupa e classificados segundo sua localização, sexo e condição (se estavam vivos ou mortos).

O intervalo entre o término do tratamento e a perfusão foi de 15 dias, como proposto por Katz e colaboradores (1989).

Esses testes foram conduzidos pelo mesmo experimentador, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, onde é mantido o ciclo de vida da linhagem BH de *Schistosoma mansoni*, e tiveram a supervisão da Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães e do Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos o programa *GraphPad InStat 3.0* para a análise estatística dos dados obtidos e aplicamos o teste de *Kruskal-Wallis* (análise de variância não-paramétrica) com teste posterior *Dunn*, sendo $p < 0,05$ considerado significativo (Zar, 1996). Os protocolos experimentais, nº 434-1 (2003) e nº 880-1 (2005), foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS SÓLIDOS DE PZQ/ β -CD

4.1.1. MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular foi a ferramenta teórica utilizada para se obter uma predição da razão molar entre as moléculas hóspede (β -CD) e a convidada (PZQ) no complexo (**Figura 11**). As moléculas foram montadas e modeladas inicialmente no programa HyperChem 6.0, onde tiveram suas estruturas otimizadas. Diferentes possibilidades de interação foram testadas, gerando, assim, os arquivos de entrada mostrados na **Figura 12** e **Figura 13** e descritos em métodos, os quais foram submetidos aos cálculos no campo de força MM2, no vácuo ou em água, utilizando o programa MacroModel.

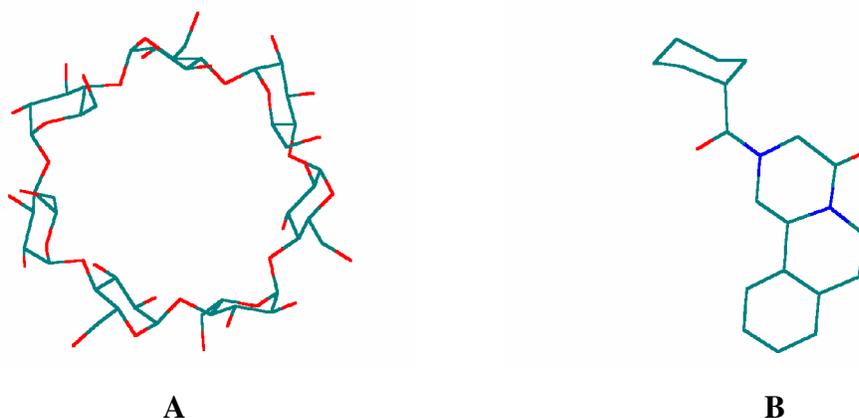


Figura 11 - Estruturas geradas pelo HyperChem para a β -Ciclodextrina (A) e Praziquantel (B).

Com isso pudemos calcular as entalpias (ΔH) de formação das moléculas, separadamente, e das diferentes formas de complexação possíveis e, a partir daí, as energias de ligação, $E_{\text{Afimidade}}$ (Lino *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2004), para as 4 formas de interação na estequiometria 1:1 (**Figura 12**) e para as 3 conformações na estequiometria 1:2 (**Figura 13**).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

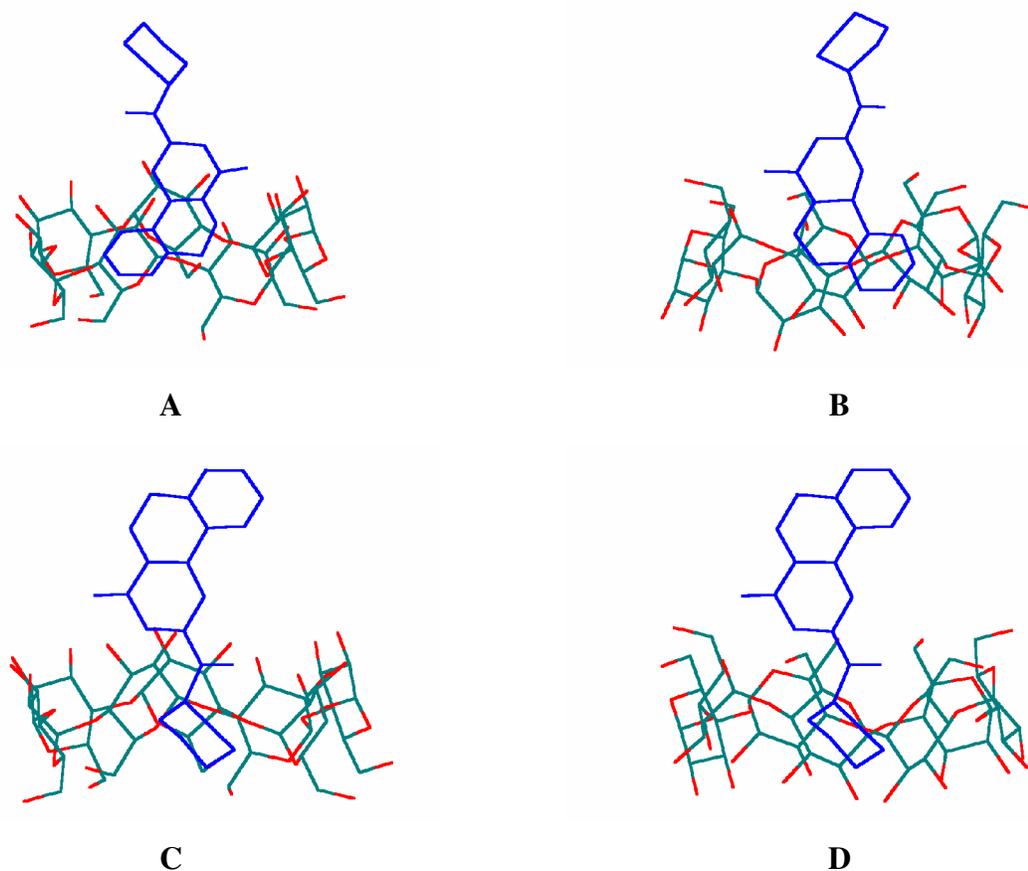


Figura 12 - Estruturas geradas pelo HyperChem utilizadas para início dos cálculos de minimização de energia.

A. Anel isoquinolínico dentro da borda; B. Anel isoquinolínico dentro da coroa;
C. Anel isoquinolínico fora da borda; D. Anel isoquinolínico fora da coroa.

A energia de afinidade (Balabai *et al.*, 1998) é calculada através da equação:

$$E_{\text{afinidade}} = \Delta H_{fSL} - (\Delta H_{fS} + \Delta H_{fL}) \quad 8$$

onde S é o soluto de interesse, L é o sistema macromolecular ligante β-CD e SL representa o complexo de inclusão formado.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

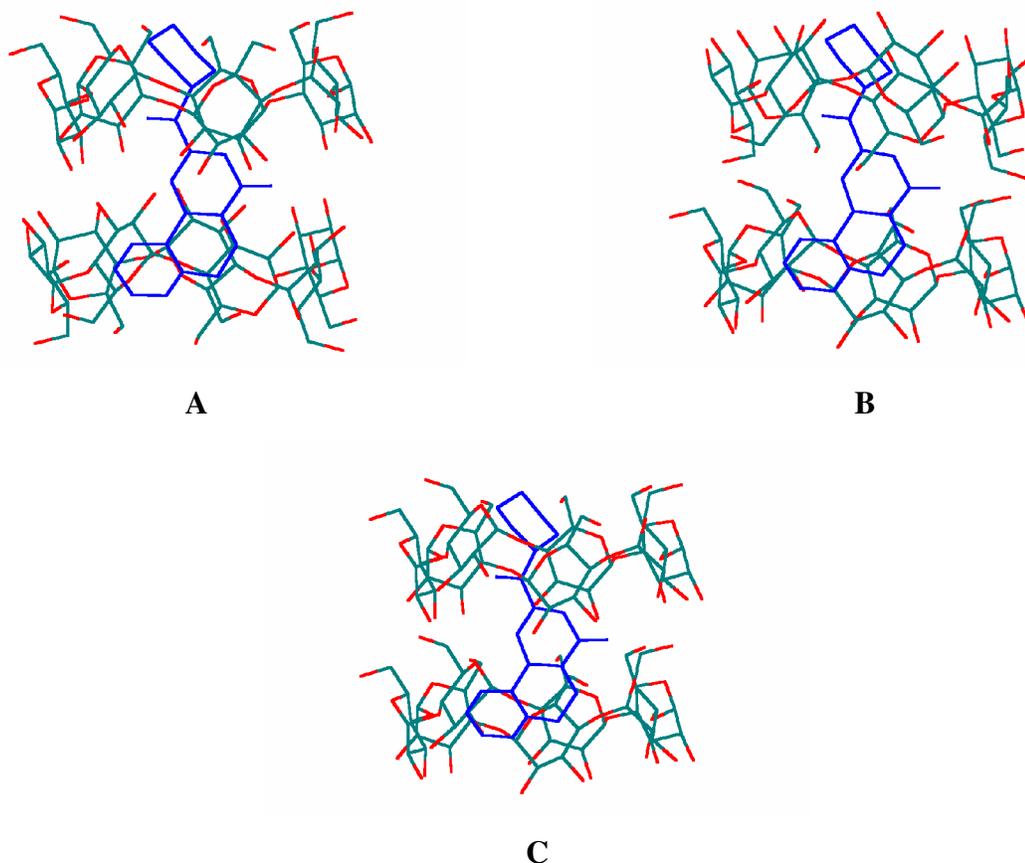


Figura 13 - Estruturas geradas pelo HyperChem utilizadas como entrada nos cálculos de minimização de energia. A. Borda:Borda; B. Coroa:Coroa; C. Borda:Coroa.

A **Tabela 5** mostra os valores de ΔH (obtidos através dos cálculos de MM2 no vácuo). Utilizando a **Equação 8** e as respectivas energias de afinidade. Pelos valores (negativos) de $E_{\text{Afinidade}}$ podemos notar que a formação do complexo no vácuo é energeticamente e entalpicamente favorável para todas as possibilidades de interação testadas.

Tabela 5 - Valores de Entalpias (ΔH) e energia de afinidade, no vácuo.

Orientações	MM2			
	$\Delta H S$ (kcal)	$\Delta H CD$ (kcal)	$\Delta H SCD$ (kcal)	$E_{\text{Afinidade}}$ (kcal)
Isoquinolínico fora da borda	31,45	-546,12	-527,74	-13,07
Isoquinolínico fora da coroa	31,45	-546,12	-527,56	-12,89
Isoquinolínico dentro da borda	31,45	-546,12	-532,15	-17,48
Isoquinolínico dentro da coroa	31,45	-546,12	-530,51	-15,84
PZQ em borda:borda	-532,15	-546,12	-1108,95	-30,68
PZQ em coroa:coroa	-532,15	-546,12	-1093,64	-15,37
PZQ em coroa:borda	-532,15	-546,12	-1094,37	-16,10

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as possibilidades testadas para a estequiometria 1:1, aquelas em que o anel isoquinolínico foi inserido na cavidade da β -CD (**Figura 12A e B**) foram as que apresentaram os valores mais negativos de energia de ligação, com um abaixamento de energia um pouco maior para a orientação do anel isoquinolínico inserido na borda (-17,48 kcal), do que inserido na coroa (-15,84 kcal).

Nas simulações para a estequiometria 1:2, os valores de energia de afinidade, nas disposições coroa:coroa e coroa:borda foram bem próximos aqueles encontrados para as orientações da estequiometria 1:1, demonstrando que a interação de uma segunda ciclodextrina ao complexo (1:1) não traz uma contribuição significativa para o abaixamento de energia do complexo.

Diferentemente, o valor da energia de afinidade obtido na conformação PZQ/ β -CD 1:2 borda:borda foi de -30,68 kcal, que é bem mais negativo do que aqueles encontrados na estequiometria 1:1, onde se obteve uma redução na energia de afinidade de aproximadamente -17 kcal para as conformações mais estáveis. Este dado indica que a interação do PZQ com mais de uma ciclodextrina, através das bordas destas, (região que apresenta hidroxilas primárias expostas, ver **Figura 13A**), permite maior estabilidade do PZQ, resultando em uma significativa redução na energia de afinidade.

Os dados obtidos até então apontavam para a formação de um sistema em que teríamos a formação do complexo 1:1, onde o anel isoquinolínico se inseriria na abertura maior da β -CD, seguido da associação de uma segunda molécula de CD, interagindo de forma borda:borda com a primeira e acomodando a porção do ciclohexano do PZQ.

Entretanto, essas simulações foram realizadas no vácuo, isto é, desconsiderando o efeito solvente. Para maior aproximação com os dados experimentais optamos por fazer os cálculos considerando o efeito do solvente, neste caso a água, de grande importância para a formação e manutenção do complexo de inclusão, como previamente descrito (Cervelló *et al.*, 2000).

Para as simulações do meio aquoso foi utilizado o sistema GB/SA, que é capaz de simular a camada de solvatação da água por um modelo não-explícito dessas moléculas (Cervelló *et al.*, 2000; Lino *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2004). Este modelo, baseado na simulação de um campo eletrostático com distribuição estatisticamente balanceada ao redor das moléculas *host* e *guest*. Ele foi adotado devido à complexidade do sistema, onde há a

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

dificuldade em explicitar a camada de solvatação da água cujas moléculas teriam que ser consideradas uma a uma e o cálculo das interações sofreria um aumento de esforço computacional proporcional ao número de moléculas empregadas.

A **Tabela 6** mostra os valores de entalpia e energia de afinidade, realizados em solvente aquoso.

Tabela 6 - Valores de Entalpias (ΔH) e energia de afinidade, em água.

Orientações	MM2			
	ΔH S (kcal)	ΔH CD (kcal)	ΔH SCD (kcal)	$E_{\text{Afinidade}}$ (kcal)
Isoquinolínico fora da borda	25,55	-547,43	-536,00	-14,12
Isoquinolínico fora da coroa	25,55	-547,43	-531,22	-9,34
Isoquinolínico dentro da borda	25,55	-547,43	-537,91	-16,03
Isoquinolínico dentro da coroa	25,55	-547,43	-540,00	-18,12
PZQ em borda:borda	-540	-547,43	-1088,66	-1,23
PZQ em coroa:coroa	-540	-547,43	-1087,48	-0,05
PZQ em coroa:borda	-540	-547,43	-1087,74	-0,31

Novamente, para a estequiometria 1:1, as conformações do anel isoquinolínico inserido na cavidade da β -CD (**Figura 12A e B**) foram as que apresentaram os maiores abaixamento de energia, refletido em seus valores de energia de afinidade (-16,03 e -18,12 kcal, respectivamente). Observa-se, também, que as diferenças entre os posicionamentos do anel isoquinolínico dentro e fora da borda não são tão evidentes, comportamento distinto do observado com relação à coroa.

Os valores de energia de afinidade obtidos para estequiometria 1:2 mostram que, em água, a formação desse complexo não é mais tão favorável quanto havia sido previsto no vácuo, pois os valores de energia de afinidade são muito próximos de 0 kcal. Essas diferenças indicam a importância da contribuição das moléculas de água no processo de formação do complexo, mais especificamente na inserção da molécula hóspede na cavidade da β -CD. Ainda, a orientação do anel isoquinolínico não demonstrou ter relevância no processo, uma vez que as diferenças de energia entre as posições dentro e fora da cavidade da β -CD (**Figura 13**) não apresentaram valores diferentes entre si para indicar qualquer influência, resultado este bastante diferente daqueles obtidos nos cálculos no vácuo.

Em suma, pudemos comprovar a importância de considerar o efeito do solvente na realização das simulações, pois é visível que sua ausência pode levar a resultados errôneos na

análise das forças que levam à formação do complexo. Quando consideramos o efeito solvente vemos que a interação do PZQ com a β -CD resulta em um fenômeno favorável para a estequiometria 1:1, com diferenças significativas na forma que o PZQ aproxima-se da coroa da ciclodextrina, seja pelo anel isoquinolínico ou pelo ciclohexano. Considerando o número de possibilidades nas quais é possível ocorrer a formação do complexo *host-guest*, conclui-se que a formação dos complexos PZQ/ β -CD na proporção 1:1 é igualmente favorável nas configurações com o anel isoquinolínico dentro ou fora da borda e dentro da coroa, mas é menos favorável para a configuração do anel isoquinolínico fora da coroa, haja visto as diferenças na energia de afinidade, descritos na **Tabela 6**.

4.1.2. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Análises térmicas como a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA), são muito empregadas para o estudo de complexos de inclusão no estado sólido. Isso pode ser observado no grande número de citações encontradas em bancos de dados, quando se pesquisa por palavras como *inclusion compound* (complexo de inclusão) e *thermal analysis* (análise térmica), ou palavras relacionadas, como DSC, TGA, entre outras (Giordano *et al.*, 2001).

A análise térmica é um método de rotina comumente utilizado para uma investigação rápida e qualitativa de complexos de inclusão (Giordano *et al.*, 2001; Frömming & Szejtli, 1994). Para a análise de DSC foram utilizadas amostras contendo PZQ, β -CD, os complexos 1:1 e 1:2 de PZQ/ β -CD e também suas respectivas misturas físicas.

Com a calorimetria diferencial de varredura obtivemos os termogramas mostrados na **Figura 14**, através dos quais é possível notar os picos endotérmicos que caracterizam cada substância isoladamente e também os complexos de inclusão.

Em geral, as ciclodextrinas são vendidas, com graus de hidratação que podem variar, dependendo da forma de estocagem e, na análise de complexos de inclusão, do processo utilizado para sua preparação. Uma molécula de β -CD pode acomodar até 7 moléculas de água em sua cavidade, enquanto que outras 5,4 moléculas podem ocupar os espaços intersticiais (Giordano *et al.*, 2001).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma revisão sobre análises térmicas de ciclodextrinas e complexos de inclusão, Giordano e colaboradores (2001), mostraram que o termograma da β -CD pode ser dividido em três partes: (1) um primeiro pico referente à perda de moléculas de água de solvatação para o ambiente, em temperaturas acima de 120 °C; (2) um segundo pico onde ocorre a degradação térmica, acompanhada de oxidação pelo ar, e que se inicia em temperaturas acima de 250 °C no estado sólido e continua no estado líquido (após a fusão, que ocorre próximo a 300 °C) e (3) combustão, em temperaturas acima de 300 °C (Giordano *et al.*, 2001).

O termograma da β -CD, entre 30 e 200 °C, está representado na **Figura 14A** onde é possível observar um pico em 140,5 °C, relativo à perda das água de solvatação da cavidade.

No mesmo tipo de experimento o PZQ (**Figura 14B**) possui um pico de fusão estreito e característico, em 145,1 °C (Becket *et al.*, 1999).

Os termogramas das **Figura 14C** e **Figura 14D** são relativos às misturas físicas PZQ/ β -CD, nas estequiometrias, 1:2 e 1:1, respectivamente. Para a mistura física 1:1 (**D**) é possível notar características próprias das substâncias puras (PZQ e β -CD), sendo que os picos, tanto do PZQ quanto da β -CD, apresentam-se levemente deslocados (130,3 e 142,0 °C). Para a mistura física na estequiometria 1:2 (PZQ/ β -CD) não foi possível observar o pico relativo ao PZQ, mas somente um pico em ca. de 133,15 °C, provavelmente devido ao relativo excesso de β -CD naquelas preparações (1:2). O perfil apresentado pela análise das misturas físicas (1:1 e 1:2) demonstra não estar havendo uma interação molecular de inclusão molecular significativa, ou seja, não acontece a formação do complexo de inclusão, neste caso, mas sim a mistura das amostras, no estado sólido.

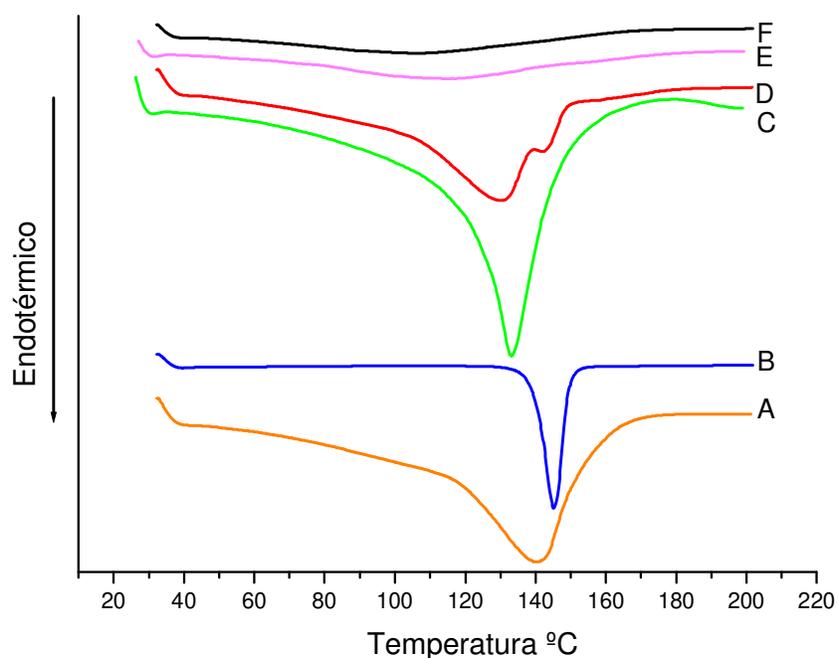


Figura 14 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura de amostras de β -CD (A), PZQ (B), mistura física PZQ/ β -CD 1:2 (C) e 1:1 (D) e complexos de inclusão PZQ/ β -CD 1:2 (E) e 1:1 (F).

Os termogramas dos complexos estão representados nas **Figura 14E** (1:2) e **Figura 14F** (1:1). Em ambos os casos podemos notar que houve uma grande diminuição da energia de transição endotérmica. Isso é atribuído à remoção das moléculas de água que solvatavam o interior da cavidade da β -CD, para a inserção do PZQ. Assim, fica evidenciada, qualitativamente, a formação dos complexos de inclusão em ambas as razões molares (1:1 e 1:2) testadas, com o PZQ ocupando a cavidade da β -CD, como foi previsto pelos cálculos de modelagem molecular (item 4.1.1, de Resultados e Discussões) e em concordância com resultados de microscopia eletrônica (a seguir).

4.1.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para uma análise morfológica do complexo formado. A caracterização físico-química do complexo de inclusão PZQ/ β -CD em diferentes razões molares foi também evidenciada, completamente, através de outros métodos como DSC, isotermas de solubilidade e RMN.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas imagens das substâncias puras, isto é, β -CD (**Figura 15**) e PZQ (**Figura 16**), de misturas físicas nas diferentes razões molares 1:1 (**Figura 17**) e 1:2 (**Figura 18**) e dos complexos de inclusão (PZQ/ β -CD), também nas duas razões molares 1:1 (**Figura 19**) e 1:2 (**Figura 20**).

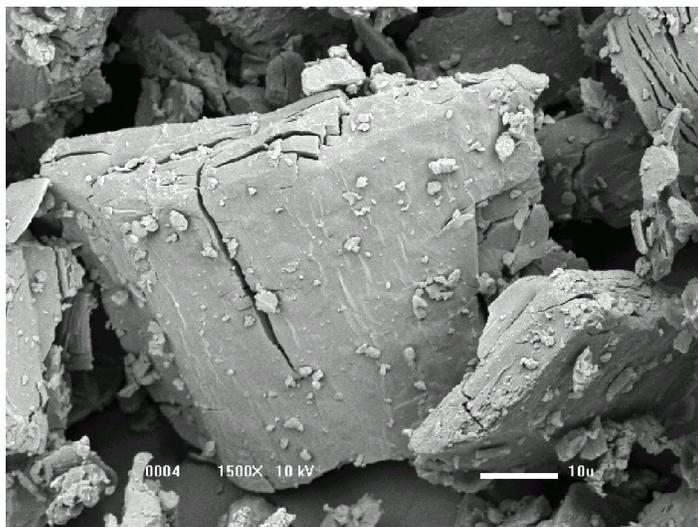


Figura 15 - Micrografia eletrônica de varredura da β -CD pura.
Aumento de 1500x.

A **Figura 15** mostra um cristal típico de β -CD. Tais cristais possuem dimensões de algumas dezenas de micra, superfície lisa e contornos definidos.

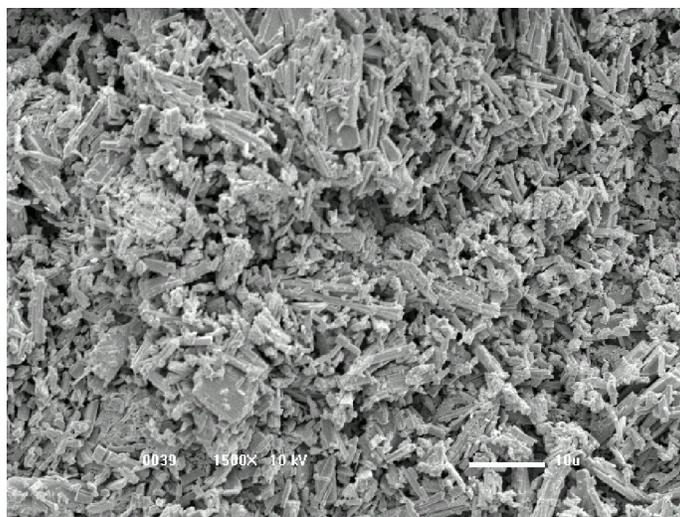


Figura 16 - Micrografia eletrônica de varredura do PZQ puro.
Aumento de 1500x.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Já os cristais de PZQ (**Figura 16**) possuem forma cilíndrica, são finos e alongados e, geralmente, não costumam atingir uma dezena de micras. Os cristais de PZQ são bastante distintos daqueles de β -CD o que, facilmente, nos permite identificá-los na mistura física de compostos (**Figura 17** e **Figura 18**).

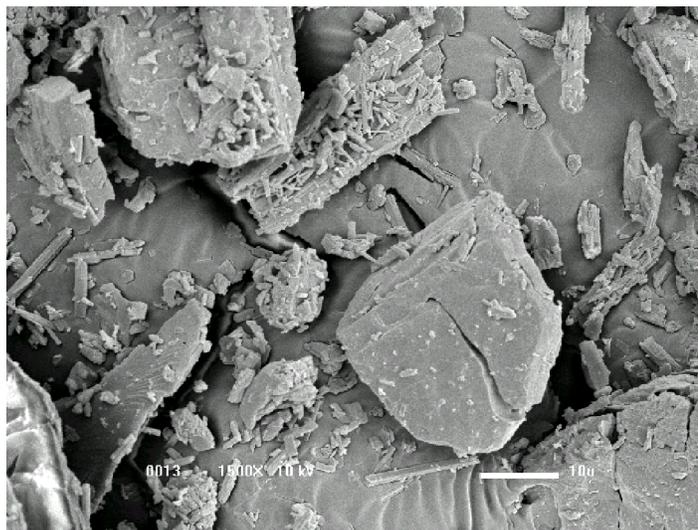


Figura 17 - Micrografia eletrônica de varredura da mistura física na razão molar 1:1. Aumento de 1500x.

Assim, na análise das micrografias relativas às misturas físicas de PZQ e β -CD fica clara a presença de ambos os padrões de cristal apresentados anteriormente, pelas substâncias puras. É possível notar na **Figura 17** estruturas filiformes relativas ao PZQ, depositadas sobre estruturas maiores que, morfologicamente, assemelham-se a cristais de β -CD. Resultado semelhante é notado na **Figura 18**, onde é evidente um grande cristal de β -CD, envolto por pequenas partículas de cristais de PZQ.

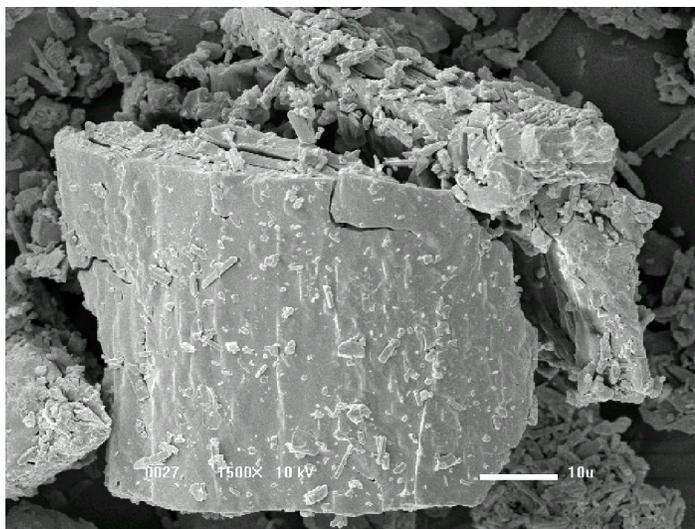


Figura 18 - Micrografia eletrônica de varredura da mistura física na razão molar 1:2. Aumento de 1500x.

A morfologia apresentada pelas misturas físicas (**Figura 17** e **Figura 18**) demonstra que o contato físico que ocorre entre as moléculas de PZQ e β -CD no estado sólido, não é suficiente para que se formem complexos de inclusão, capazes de modificar o padrão estrutural dos cristais das moléculas puras. Essa afirmação fica evidenciada ao observarmos as micrografias dos complexos de inclusão obtidos (**Figura 19** e **Figura 20**). Neles verificou-se a perda do padrão característico dos cristais de PZQ e β -CD e o aparecimento de um pó amorfo, característico da formação de complexos de inclusão, de dimensões menores que aquelas encontradas nos cristais das substâncias puras, em ambas as estequiometrias testadas.

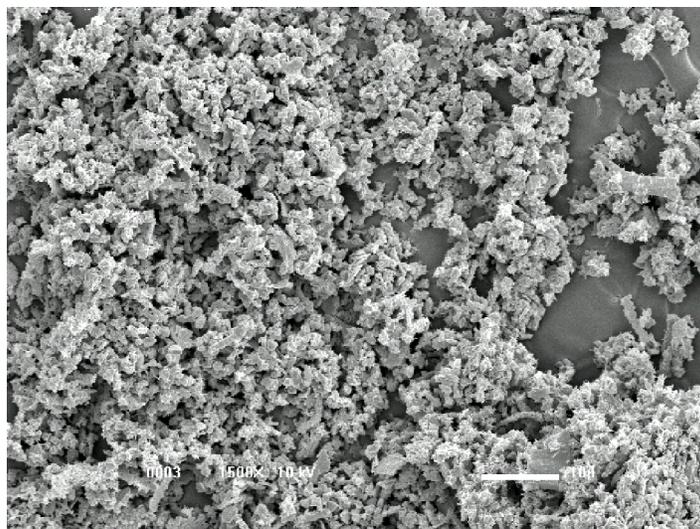


Figura 19 - Micrografia eletrônica de varredura do complexo de inclusão PZQ/β-CD, 1:1. Aumento de 1500x.

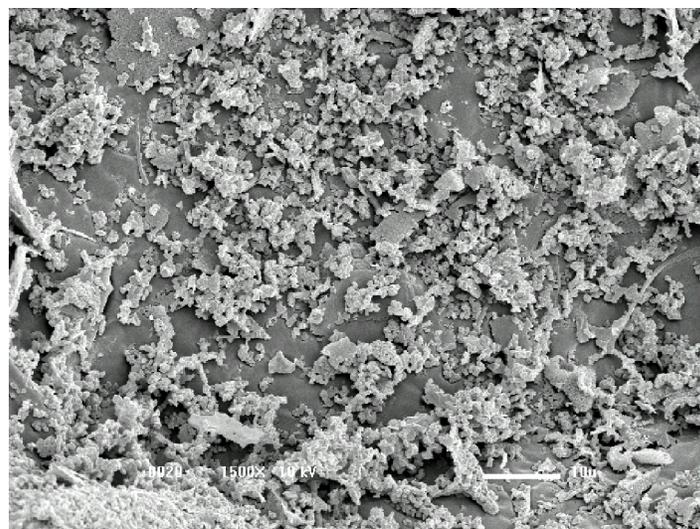


Figura 20 - Micrografia eletrônica de varredura do complexo de inclusão PZQ/β-CD, 1:2. Aumento de 1500x.

Essas mudanças na morfologia dos cristais são uma forte evidência da formação dos complexos de inclusão, corroborando os resultados obtidos por outras técnicas, como o DSC (item 4.1.2, de Resultados e Discussões) e RMN (item 4.1.7, de Resultados e Discussões).

Entretanto, assim como os resultados de DSC esta técnica não permitiu determinar qual das duas razões molares do complexo seria mais efetiva, motivo pelo qual ensaios de solubilidade com variação de concentração da β-CD foram realizados.

TESTE DE SOLUBILIDADE

4.1.4. COEFICIENTE DE ABSORTIVIDADE MOLAR (ϵ) DO PZQ EM ÁGUA

Para determinação de solubilidade do PZQ em água e na presença de β -CD, bem como para quantificação do PZQ em solução, usamos as propriedades ópticas do mesmo, medidas no UV.

Através da análise dos valores de absorvância correspondentes a concentrações conhecidas de PZQ em água, a uma temperatura controlada ($25 \pm 0,5$ °C) foi construída uma curva analítica (**Figura 21**) através da qual foi possível determinar o valor da constante de absorvância molar do PZQ (ϵ), em 270 nm, comprimento de onda de máxima absorção do mesmo, no UV.

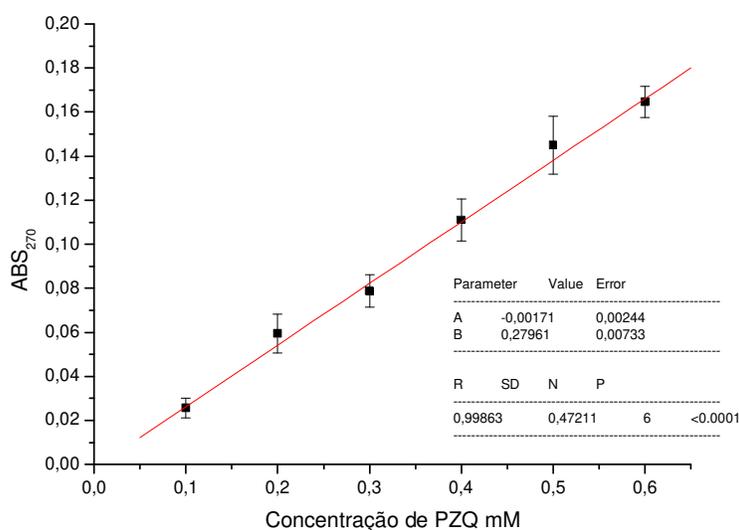


Figura 21 - Determinação da constante de absorvância molar do PZQ em 270 nm, em água.

O valor da absorvância molar ($\epsilon_{270}=279,61$ L mol⁻¹ cm⁻¹) foi utilizado para a determinação das concentrações de PZQ nos testes de isotermas de solubilidade (item 4.1.5, Resultados e Discussões).

4.1.5. ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE

Becket e colaboradores (1999) estudando o complexo de inclusão do PZQ com as diversas ciclodextrinas naturais, concluiu que a β -CD era a mais adequada para o preparo de complexos de inclusão. Em seus estudos o complexo era preparado em água, sob agitação constante, que perdurava por 7 dias, até atingir o equilíbrio (Becket *et al.*, 1999).

O método de isotermas de solubilidade foi utilizado para determinar a constante de ligação PZQ/ β -CD, analisado na primeira hora e diariamente até o sexto dia. Diferentemente dos dados obtidos por Becket e colaboradores (1999), o equilíbrio de formação do complexo de inclusão (medido pelo aumento da solubilidade do PZQ em água) foi atingido na primeira hora, como mostra a **Figura 22**.

Acompanhamos, através da isoterma de solubilidade, o tempo para o equilíbrio de formação do complexo de inclusão PZQ/ β -CD (**Figura 22a**). A solubilidade do PZQ aumenta consideravelmente, já nas primeiras horas de agitação e é proporcional ao aumento na concentração de β -CD e é possível notar que para cada concentração de β -CD, até 12 mM, não houve mudanças significativas na solubilidade do fármaco no decorrer dos sete dias (**Figura 22b**).

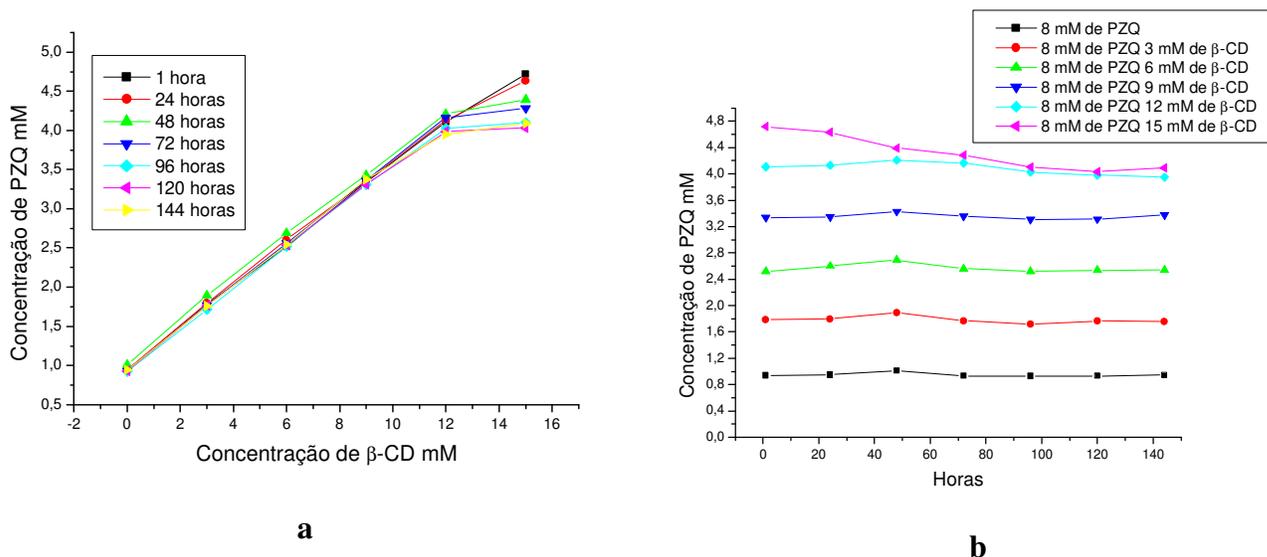


Figura 22 - Isotermas de solubilidade PZQ/ β -CD (n=3).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Figura 23** é possível observar que houve um aumento na concentração do PZQ em água de cerca de 1 mM para 4 mM quando ligado na β -CD. A análise deste experimento evidencia uma isoterma do tipo A_L , isto é: com um aumento linear de solubilidade, caracterizando a estequiometria de 1:1 para o complexo PZQ/ β -CD. Assumindo a estequiometria 1:1 foi possível utilizar a **Equação 1**, como proposto por Higuchi & Connors (1965), a constante de afinidade ($440,83 \text{ M}^{-1}$) que teve um valor muito próximo aquele obtido Becket e colaboradores ($396,91 \text{ M}^{-1}$) através da mesma metodologia (Becket *et al.*, 1999).

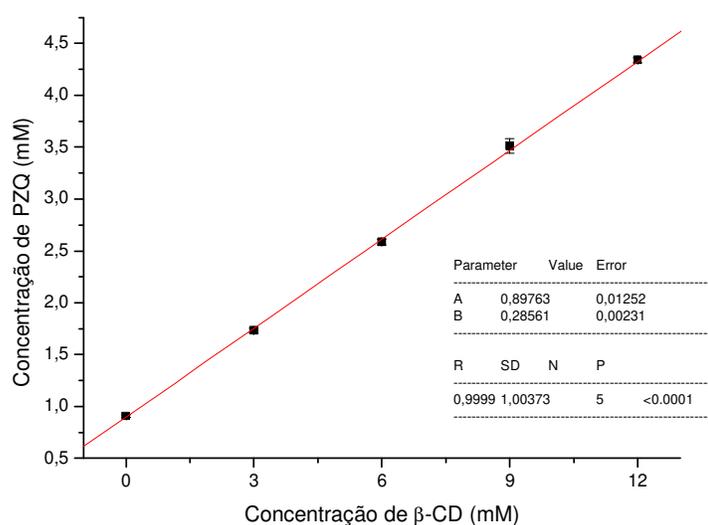


Figura 23 - Isoterma de solubilidade do PZQ em presença de concentrações crescentes de β -CD (0 até 12 mM, n=3).

É evidente o aumento da concentração do PZQ em água com o concomitante aumento da concentração de ciclodextrina (**Figura 23**) indicando que as moléculas estão interagindo, muito provavelmente formando os complexos de inclusão. Entretanto esse aumento se dá até valores próximos ao limite de solubilidade da β -CD, que é de cerca de 16 mM (Frömming & Szejtli, 1994; Davis & Brewster, 2004). A concentração de 15 mM de β -CD apresentou um padrão de interação molecular diferenciado, fato que pode ser atribuído à precipitação de β -CD nesta concentração, muito próxima de seu limite de solubilidade (**Figura 22a**).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.6. EXPERIMENTOS DE RMN

4.1.6.1. EXPERIMENTOS DE ^1H -RMN PARA A ATRIBUIÇÃO DO PZQ

Os espectros ^1H -RMN foram realizados em D_2O . Primeiramente foi realizada a atribuição dos hidrogênios do PZQ puro para que fosse possível a interpretação dos dados obtidos com o complexo de inclusão.

Iniciamos os estudos com um espectro de ^1H -RMN unidimensional do PZQ (**Figura 24**). Neste espectro podemos encontrar picos em diversas regiões, mostrando que o PZQ possui núcleos de hidrogênio submetidos a diversos ambientes químicos, o que causa uma dispersão dos picos no espectro.

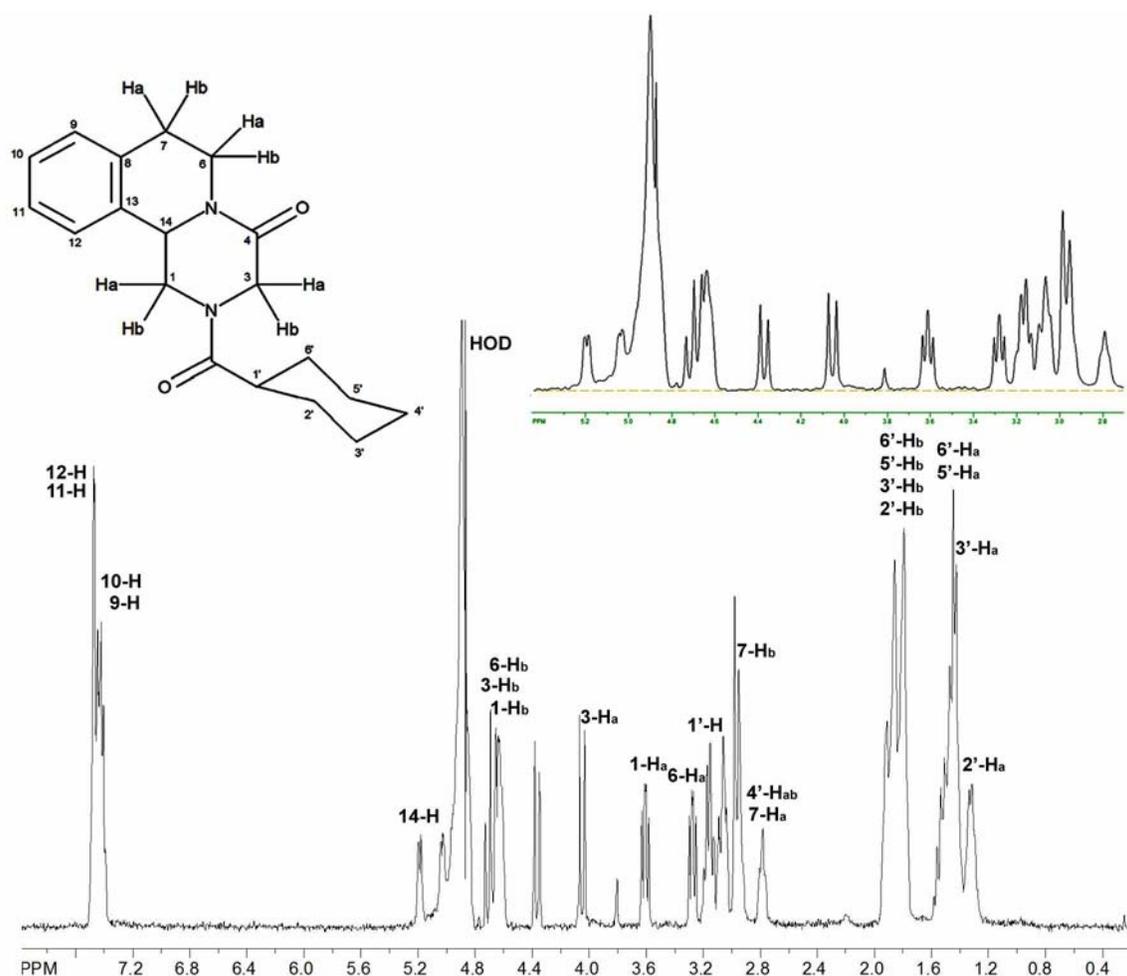


Figura 24 - Espectro de ^1H -RMN do PZQ, 1mM, 20 °C, 500MHz.

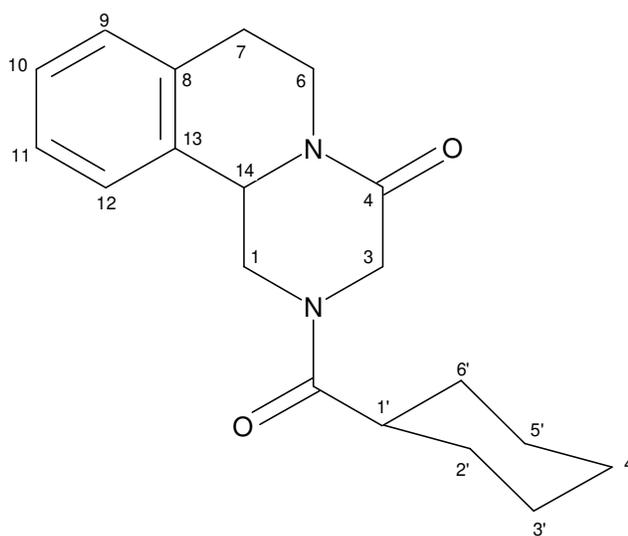
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas regiões do espectro são muito características o que facilita a atribuição. Por ex., as regiões dos hidrogênios do anel aromático (6 a 8 ppm) e a dos hidrogênios ciclo hexano (1,5 a 3,0 ppm) (Silverstein *et al.*, 1991). Para o PZQ é possível identificar os hidrogênios do anel aromático em valores próximos a 7,4 ppm. Já o ciclo hexano possui hidrogênios bastante protegidos por uma densa nuvem eletrônica e, portanto, têm seus picos em valores de deslocamento químico entre 1,5 e 3,0 ppm (**Figura 24 e Tabela 7**).

Entretanto, nem todas as regiões são tão características a ponto de se concluir a atribuição dos picos do PZQ apenas com um espectro $^1\text{H-RMN}$ monodimensional. Além disso há, em algumas regiões do espectro, uma grande sobreposição de picos, o que dificulta ainda mais a atribuição. Para contornar esses empecilhos lançamos mão de experimentos bidimensionais, que são capazes de separar melhor os valores de deslocamento químico dos núcleos de hidrogênios e dos carbonos do PZQ, de acordo com suas características químicas.

Tabela 7 - Atribuição dos hidrogênios do PZQ em espectro $^1\text{H-RMN}$.

H	PZQ	
	$\delta_{\text{Ha/Hb}}$ ppm	δ_{C} (ppm)
1	3,53 / 4,57	51,08
3	3,95 / 4,62	48,50
6	3,08 / 4,54	42,44
7	2,80 / 2,94	30,56
9	7,41	129,51
10	7,42	128,21
11	7,38	130,35
12	7,33	131,75
14	5,12	57,90
1'	3,20	47,01
2'	1,24 / 1,72	27,85
3'	1,36 / 1,77	31,26
4'	2,70 / 2,85	42,89
5'	1,44 / 1,85	31,62
6'	1,35 / 1,79	27,64



IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados, então, experimentos bidimensionais de COSY (**Figura 25**), que forneceu informações sobre as correlações escalares entre os hidrogênios que estão acoplados entre si (^1H - ^1H) e C-HSQC (**Figura 26**), através do qual foi possível identificar quais hidrogênios estão ligados a quais carbonos. De posse dessas informações foi possível realizar a atribuição completa dos picos do PZQ, identificando picos mesmo em áreas do espectro onde há uma grande sobreposição.

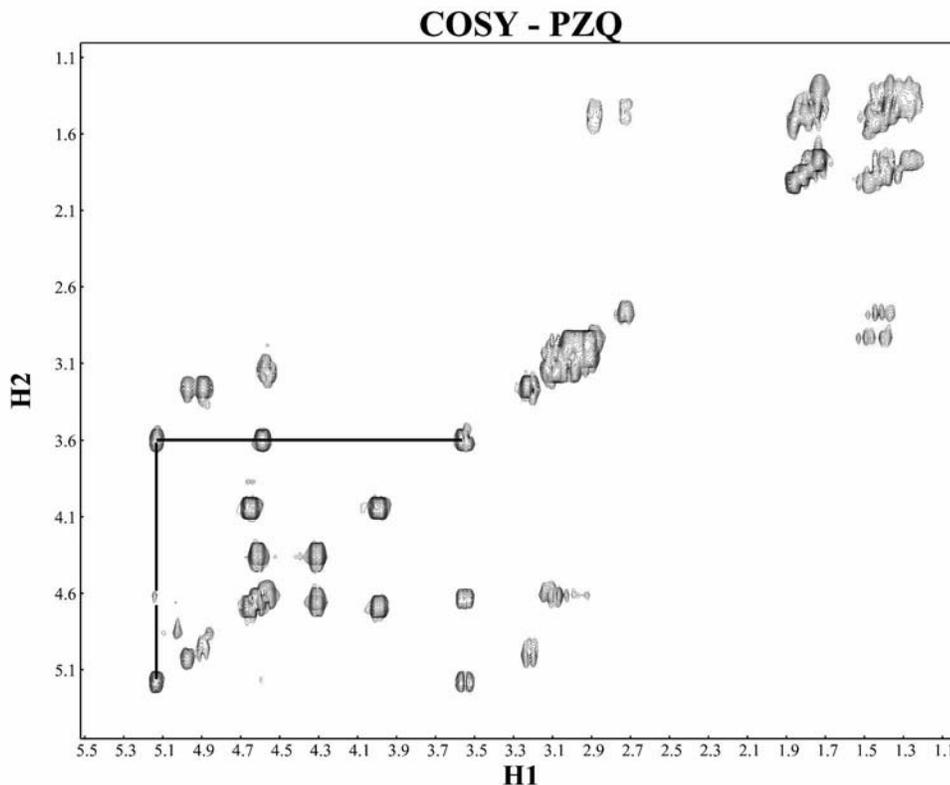


Figura 25 - Expansão do espectro 2D COSY (500 MHz; D_2O ; δ_{HOD} 4,87) do PZQ (1mM), 20°C.

No espectro ^1H -RMN do PZQ a região entre 4,5 - 4,8 ppm apresenta diversas sobreposições de picos. Já no espectro de COSY (**Figura 25**) é possível observar que estes hidrogênios estão separados ao longo da segunda dimensão, facilitando a análise do espectro.

Para completar a atribuição dos picos foram utilizados experimentos de HSQC que permite a identificação de outros núcleos, como é o caso do hidrogênio ligado ao carbono 14 (14-H) (**Figura 24**). Neste caso o 14-H é o único hidrogênio ligado a esse carbono e, além disso, possui apenas outros dois hidrogênios como vizinhos, como mostrado na **Figura 26**.

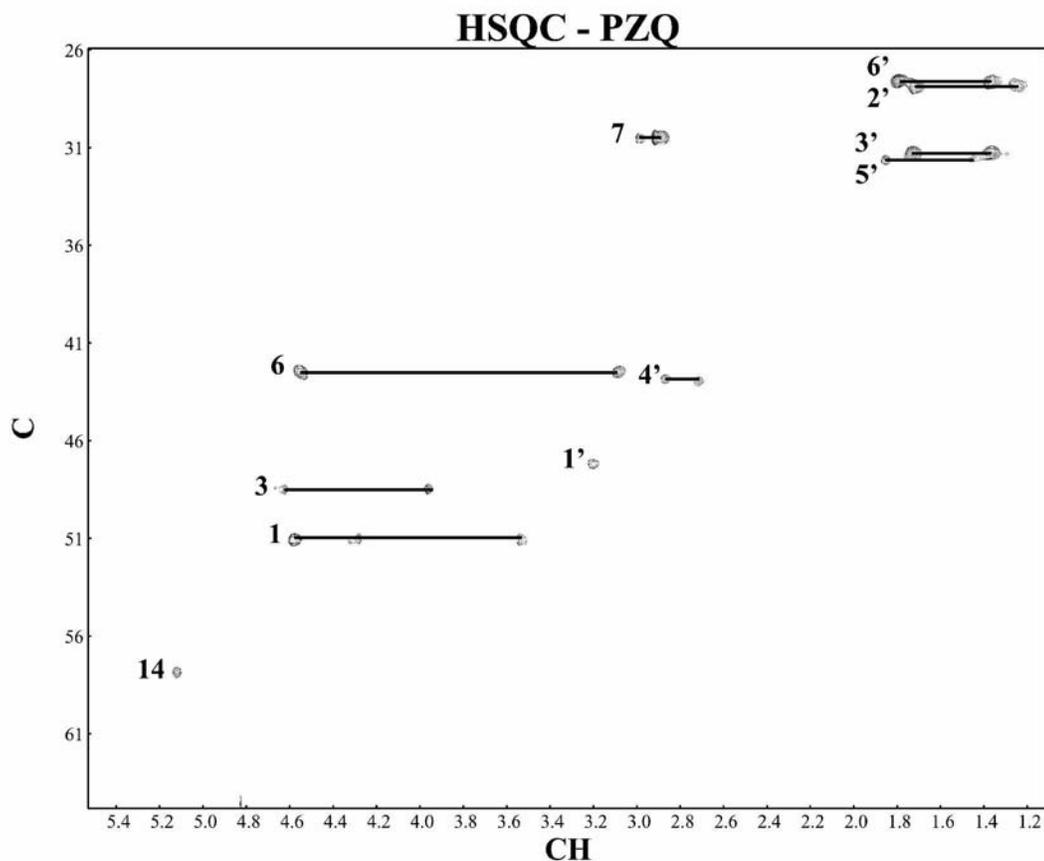


Figura 26 - Espectro 2D C-HSQC (500 MHz; D₂O; δ_{HOD} 4,87) do PZQ (1mM).

Uma análise do espectro de C-HSQC mostra que apenas dois carbonos na molécula (¹³C) estão ligados a um único hidrogênio: um carbono em 57,9 ppm e outro em 47,01 ppm. O carbono em 57,9 ppm possui correlação com um hidrogênio em 5,12 ppm, como destacado na **Figura 25**. Ainda no espectro de COSY, vemos que o hidrogênio em 5,12 ppm se relaciona a outros dois hidrogênios, um em 3,53 e outro em 4,57 ppm, o que indica que o mesmo está acoplado a um -CH₂. Deduzimos desta forma que o carbono 14 está na frequência 57,9 ppm e seu hidrogênio 14-H estaria em 5,12 ppm. Além disso, o carbono em 47,01 ppm possui seu hidrogênio em 3,2 ppm, próximo a região que é mais característica de um ciclo hexano de 1 a 3 ppm (Silverstein *et al.*, 1991), portanto este seria o carbono 1'. Desta forma atribuímos os hidrogênios dos dois carbonos da molécula que possuem apenas um hidrogênio ligados a eles.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando este mesmo raciocínio com os dados dos experimentos de COSY e C-HSQC chegamos à atribuição de todos os hidrogênios e carbonos da molécula do PZQ como é mostrado na **Figura 24** e **Tabela 7**.

4.1.6.2. EXPERIMENTOS DE RMN PARA A β -CD

O espectro unidimensional da β -CD em D_2O a $20\text{ }^\circ\text{C}$ está apresentado na **Figura 27**. A atribuição do espectro de ^1H -RMN da β -CD em meio aquoso é encontrada na literatura (Junior, 2001; Pinto *et al.*, 2005). Através da atribuição dos hidrogênios da β -CD é possível identificar quais os hidrogênios apresentam modificações quando é formado o complexo de inclusão com o PZQ (**Tabela 8**). É interessante notar que os 7 resíduos de glicose da β -CD são equivalentes, tal que, no espectro de ^1H -RMN da ciclodextrina observam-se os picos H1 a H6 de cada um dos monômeros equivalentes.

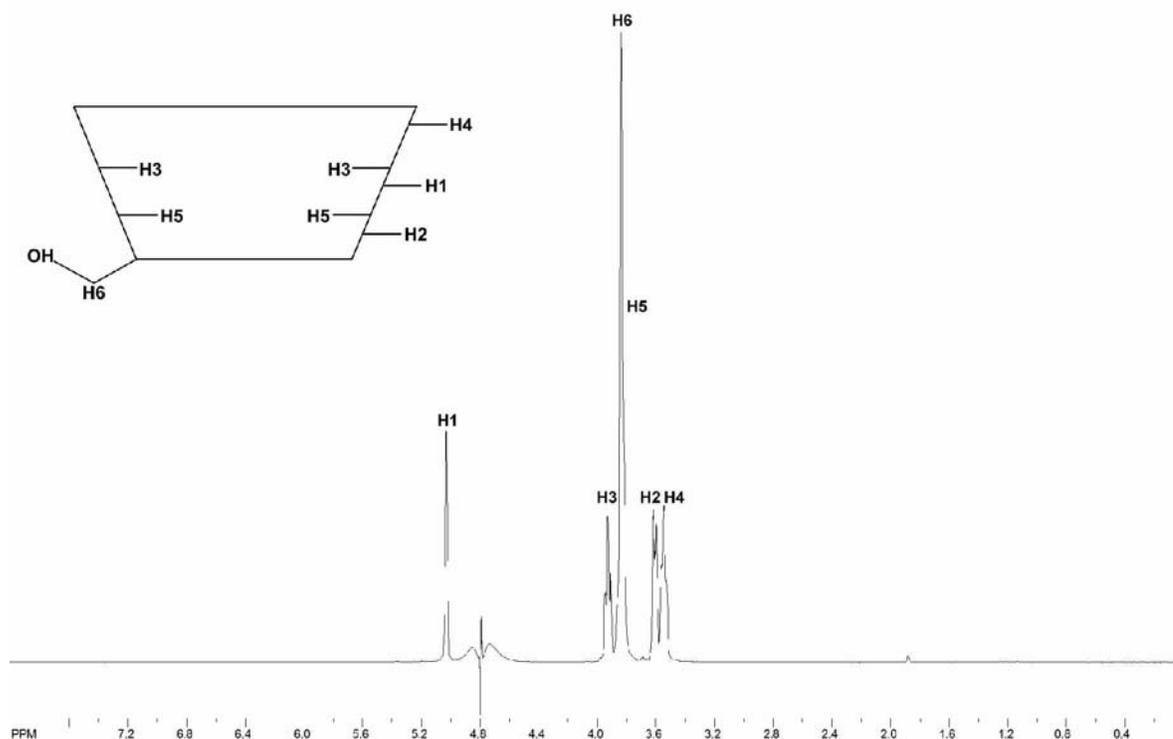
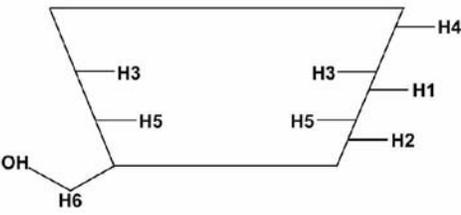


Figura 27 - Espectro ^1H -RMN (500 MHz; D_2O ; δ_{HOD} 4,87) da β -CD (2mM).

A **Tabela 8** enumera os hidrogênios de 1 a 6 da β -CD e seus deslocamentos químicos.

Tabela 8 - Atribuição dos hidrogênios da β -CD em espectro ^1H -RMN.

H	δ_{H} (ppm)
1	5,029
2	3,609
3	3,920
4	3,541
5	~3,81
6	3,845



4.1.6.3. MEDIDAS DE INTERAÇÃO PZQ/ β -CD

Para obter informações sobre a interação do PZQ com a cavidade da β -CD foi observado o efeito da presença do PZQ no deslocamento químico dos sinais da β -CD através de espectros simples de ^1H -RMN (**Figura 28**). É possível notar na **Figura 28**, que a presença do PZQ (espectro “b”) causa um deslocamento em praticamente todos os hidrogênios relativos a β -CD. Este deslocamento é esperado, pois, a formação de complexos de inclusão com pequenas moléculas, como o PZQ causa um efeito sobre a molécula hospedeira como se aumentasse a nuvem eletrônica sobre os hidrogênios da mesma, como é possível observar na **Figura 28**, tal que o deslocamento se dá sempre no sentido da direita para a esquerda (Veiga, *et al.*, 2001; Schneider, *et al.*, 1998).

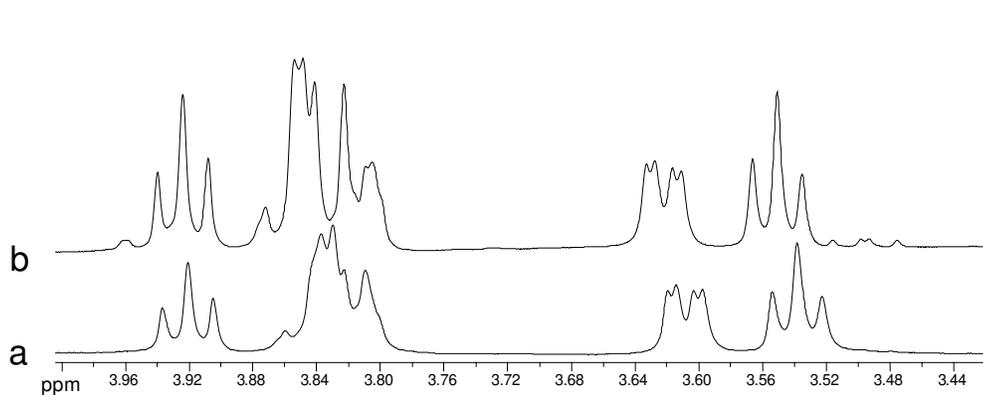


Figura 28 - Efeito do aumento da proporção de PZQ na presença de β -CD. Razão molar: a) PZQ/ β -CD 1:4; b) PZQ/ β -CD 1:1.

A partir dessas evidências, deu-se início a investigação da interação do complexo de inclusão PZQ/ β -CD através de outras medidas de RMN como medidas de difusão (DOSY) e correlações intermoleculares (ROESY), como descrito a seguir.

4.1.6.4. DOSY

A técnica de DOSY permite determinar, de forma não invasiva, o coeficiente de difusão de moléculas em solução. Ela foi desenvolvida por Morris e Johnson em 1992 e vem sendo aprimorada desde então. Esta técnica pode ser utilizada para resolver misturas de substâncias, desde que estas possuam núcleos ativos para RMN. Diversos trabalhos mostram como isso é possível devido à clara relação entre a massa molecular e o coeficiente de difusão da molécula em solução. Uma outra interessante aplicação do DOSY é a quantificação de partição ou interação de solutos com compostos macromoleculares como micelas, vesículas, proteínas e ciclodextrinas (de Souza & Laverde Jr., 2002).

Em um espectro bidimensional de DOSY temos no eixo da abscissa os deslocamentos químicos da(s) molécula(s) (em ppm) e, no eixo da ordenada, encontramos o coeficiente de difusão da molécula (em $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Podemos observar exemplos na **Figura 29** e **Figura 30**.

No espectro do PZQ, em ausência de β -CD (**Figura 29**), os picos referentes ao PZQ alinham-se em um coeficiente médio de difusão de $2,81 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Também é possível notar um pico que é referente à água residual que, devido ao seu menor raio hidrodinâmico, apresenta um alto coeficiente de difusão (ca. $11 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

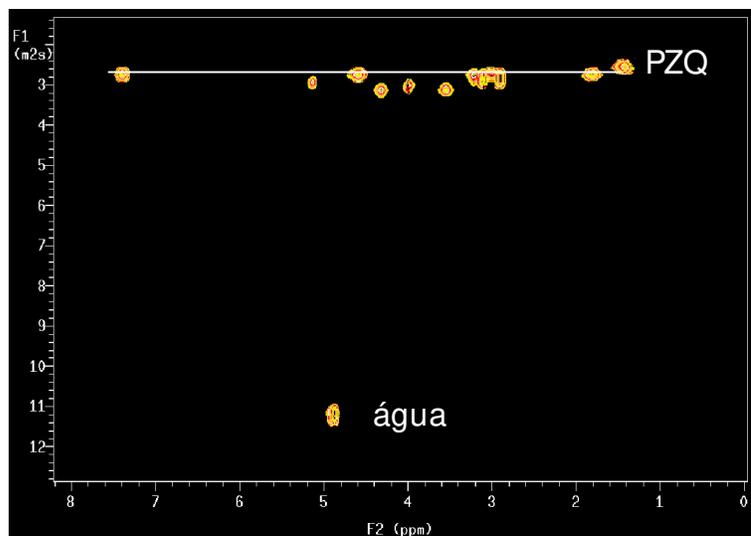


Figura 29 - Espectros de DOSY (¹H, 500MHz, BPPSTE, 25 °C) do PZQ em solução aquosa (1mM).

No espectro do complexo de inclusão (**Figura 30**) são notados três padrões de difusão. O primeiro, com um menor coeficiente de difusão, é referente à β -CD, devido a sua elevada massa molar e, por conseqüência, um grande raio hidrodinâmico; o segundo referente ao PZQ ($D_{\text{observada}}$) e, por fim, um pico de alta difusão referente à água residual, como discutido anteriormente.

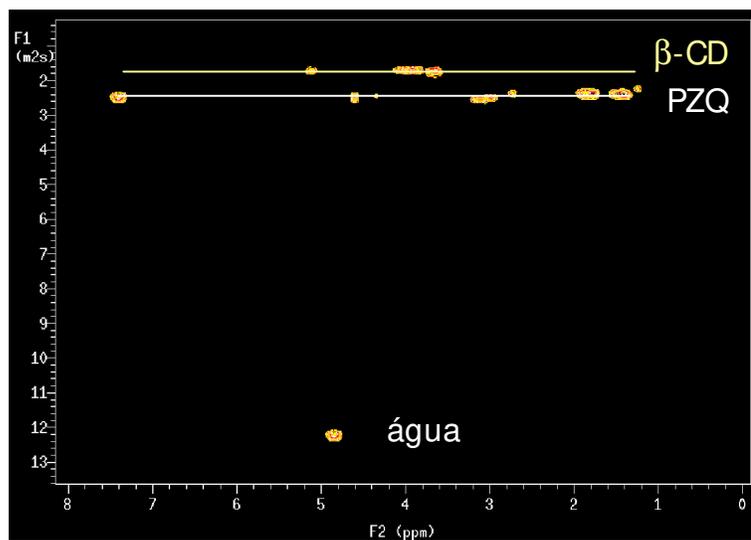


Figura 30 - Espectros de DOSY (¹H, 500MHz, BPPSTE, 25 °C) do PZQ na presença de β -CD em solução aquosa (1mM).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como explicado em Material e Métodos, item 3.2.6.3, o valor obtido para o PZQ ($D_{\text{observada}}$) é resultante de uma fração que está ligada a β -CD ($f_{\text{ligada}} \cdot D_{\text{ligada}}$), e outra referente ao PZQ livre em solução ($f_{\text{livre}} \cdot D_{\text{livre}}$).

A fração de PZQ (f_{ligada}) que está interagindo com a cavidade da β -CD causa uma diminuição no coeficiente médio de difusão do PZQ de $2,81 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ para valores próximos a $2,42 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Isso se deve ao fato de o PZQ que faz parte do complexo de inclusão (PZQ/ β -CD) comportar-se agora como uma molécula com um raio hidrodinâmico maior do que PZQ livre, tendo menor difusão e fazendo com que o valor do seu coeficiente de difusão torne-se mais próximo aos valores do coeficiente de difusão da β -CD. A diminuição no valor de coeficiente de difusão é proporcional à fração de PZQ ligado (f_{ligada}). Desta forma, foi possível utilizar as equações 2 e 3 (item 2.1.1, Material e Métodos) para calcular a fração ligada de PZQ e a constante de dissociação em ciclodextrina, uma vez que a soma das frações é igual a 1 ($f_{\text{livre}} + f_{\text{ligada}} = 1$).

$$f_{\text{compl}} = (D_{\text{livre}} - D_{\text{observada}}) \cdot (D_{\text{livre}} - D_{\text{ligada}})^{-1}$$

$$f_{\text{compl}} = 37 \%$$

$$K_{\text{ap}} = f_{\text{ligada}} / (1 - f_{\text{ligada}}) \cdot ([S] - f_{\text{ligada}} [L])$$

$$K_{\text{ap}} = 941 \pm 47 \text{ M}^{-1}$$

A **Tabela 9** lista os valores de coeficiente de difusão registrados nos casos de PZQ e β -CD. Notar que o valor de D_{ligada} é o coeficiente de difusão da β -CD pura, já que a β -CD é a macromolécula que determina a menor difusão do complexo.

Então:

Tabela 9 - Coeficientes de difusão do PZQ e β -CD ($10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Complexo	D_{livre}	D_{ligada}	$D_{\text{observada}}$
1:1	$2,81 \pm 0,11$	$1,76 \pm 0,03$	$2,42 \pm 0,08$

A fração de PZQ ligada a β -CD, segundo as medidas de DOSY, é de 37% com uma constante de associação aparente de $941 \pm 47 \text{ M}^{-1}$. Estes valores indicam que há interação

forte entre PZQ e ciclodextrina e têm uma explicação plausível, que é a alta hidrofobicidade do PZQ. Os resultados obtidos através da técnica de DOSY mostram uma interação estável entre o PZQ e a β -CD. A fração de PZQ (37%) ligada a β -CD pode ser de extrema importância no desempenho da atividade do fármaco na corrente sanguínea, onde ela é carregada por proteínas como a albumina, específicas para o transporte de moléculas hidrofóbicas; assim, uma maior quantidade total de moléculas de PZQ, livres das proteínas plasmáticas poderia desempenhar funções farmacológicas com maior potência.

Segundo Loukas e colaboradores (1998), valores de K_{ap} menores que 100 M^{-1} indicam que as forças que mantêm o complexo de inclusão são muito fracas, enquanto valores maiores que 500 M^{-1} sugerem complexos estáveis. Os valores de K_{ap} obtidos para o complexo PZQ/ β -CD foram de $440,83 \text{ M}^{-1}$, através das medidas de isoterma de solubilidade (item 4.5, Resultados e Discussão) e $941,00 \text{ M}^{-1}$ segundo a difusão molecular, medida pelo DOSY. Os valores obtidos sugerem que a interação do PZQ com a cavidade β -CD é de média forte e que o complexo formado é bastante estável. Essa diferença nos valores de K obtidos se dá devido a maior sensibilidade da técnica de DOSY nas medidas.

4.1.6.5. ROESY

A medida do Efeito Nuclear Overhouser (NOE) é muito útil para confirmar a formação de um complexo de inclusão (Spamer *et al.*, 2002), além de fornecer informações geométricas do interior da cavidade, da molécula hóspede como a proximidade espacial entre átomos, em distâncias de alguns ângstrons (Günther, 1994).

Através do espectro bidimensional de ROESY foi possível corroborar dados obtidos sobre a interação do PZQ com a β -CD, devido à detecção de proximidade espacial entre hidrogênios de ambas as moléculas. Isso foi evidenciado com os picos de correlação encontrados fora da diagonal principal do espectro, que estão destacados no recorte (na expansão do espectro original mostrado na **Figura 31**). A **Figura 31** ressalta interações entre hidrogênios do anel aromático do PZQ (abcissa) e da β -CD (ordenada); os *cross peaks* assinalados representam interações espaciais intermoleculares entre hidrogênios do PZQ e da β -CD. Pudemos observar que há uma grande interação entre as moléculas, pois ambos os hidrogênios referentes a cavidade da β -CD (H_3 e H_5) apresentaram interação com os

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

hidrogênios do anel aromático do PZQ (10, 11 e 12). Esse resultado apresenta-se de maneira coerente devido à alta hidrofobicidade da região molecular em questão. As intensidades dos NOE apresentados entre os hidrogênios H₃-10, H₃-11, H₅-11 e H₅-10 são maiores que o pico referente a interação do próton H₃ com o próton 12 do PZQ. Isso indica uma maior proximidade espacial entre os hidrogênios 10 e 11 do PZQ, pois estes desempenham maior influência gerada por uma maior transferência da energia através dos spins entre hidrogênios adjacentes, indicando que entre esses hidrogênios ocorre um acoplamento do tipo dipolar.

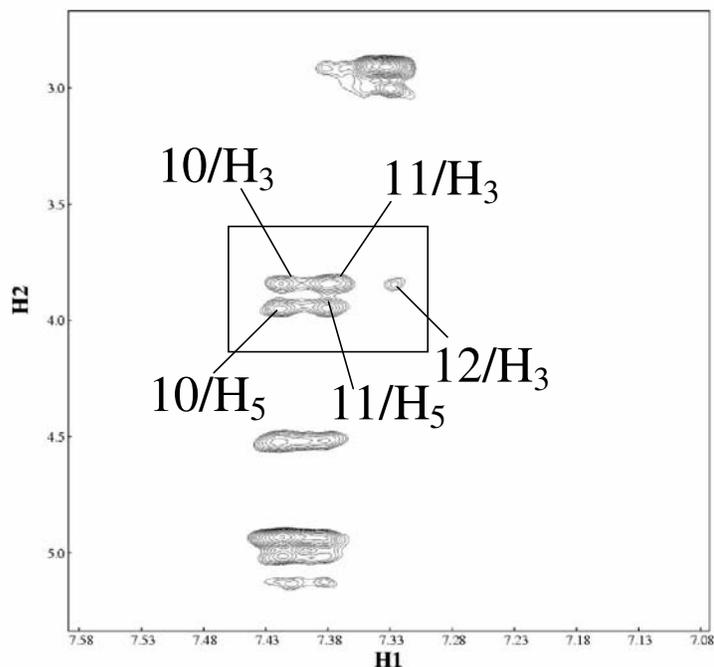


Figura 31 - Expansão do espectro bidimensional de ROESY, indicando interação entre os hidrogênios 10, 11 e 12 do PZQ com os hidrogênios H3 e H5 da β -CD.

Foram encontrados picos referentes a acoplamentos intramoleculares, o que era esperado devido a complexidade estrutural da β -CD. É interessante ressaltar que não foram encontrados outros picos de correlação intermolecular referentes a acoplamento dipolar entre quaisquer prótons das moléculas, além dos citados anteriormente.

Uma representação tridimensional do complexo, construída considerando-se os resultados obtidos com a técnica de ROESY, é mostrada na **Figura 32**.

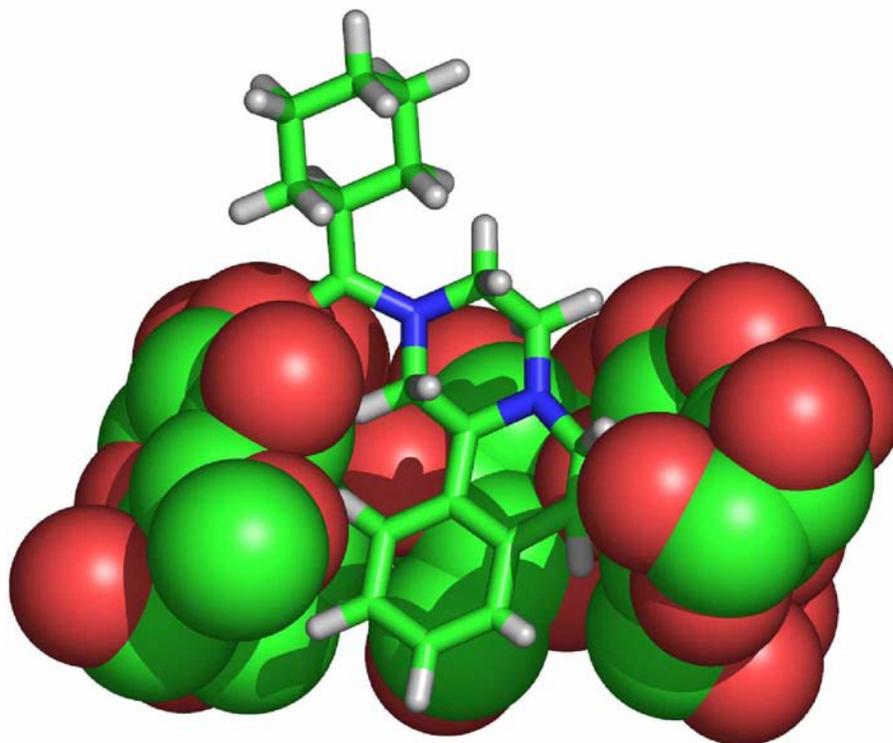


Figura 32 - Representação da estrutura do complexo PZQ/ β -CD (dois resíduos de glicose foram removidos da β -CD para facilitar a visualização).

É importante ressaltar que os dados da modelagem, feitos previamente ao testes experimentais, apresentaram excelente predição em relação a esses dados experimentais, pois na **Tabela 5** a conformação de menor energia encontrada por modelagem sugere o anel isoquinolínico se inserindo na região de coroa ou borda da β -CD, Além disso, os valores de entalpia e de energia de afinidade sugeriam que a conformação 1:2 não apresentaria grandes vantagens energéticas, para a associação destas moléculas (**Tabela 5**).

4.1.7. CULTURA DE CÉLULAS E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A linhagem de fibroblastos V79 foi utilizada para se avaliar a toxicidade das formulações de PZQ livre, β -CD e dos complexos de inclusão nas razões molares 1:1 e 1:2.

Como mostrado na **Figura 33** não foi constatado nenhum grau de toxicidade nas amostras analisadas, em nenhuma das concentrações analisadas.

As concentrações de PZQ utilizadas atingiram a solubilidade máxima do fármaco no meio de cultura em 0,5 mM. É possível que a limitada solubilidade do PZQ impedindo que concentrações maiores fossem atingidas seja a responsável pelo fato de que sua toxicidade

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

não fosse notada nesse modelo. Entretanto essas concentrações estão acima da concentração terapêutica do fármaco ($1 \mu\text{M}$ ou $0,3 \mu\text{g/mL}$), mostrando que o PZQ não possui grande citotoxicidade e que o complexo de inclusão, nas duas estequiometrias testadas 1:1 e 1:2, também não apresenta citotoxicidade, assim como a $\beta\text{-CD}$, em concordância com os resultados obtidos em nosso laboratório (Pinto, 2002) e o relatado de Corrêa e colaboradores (2005).

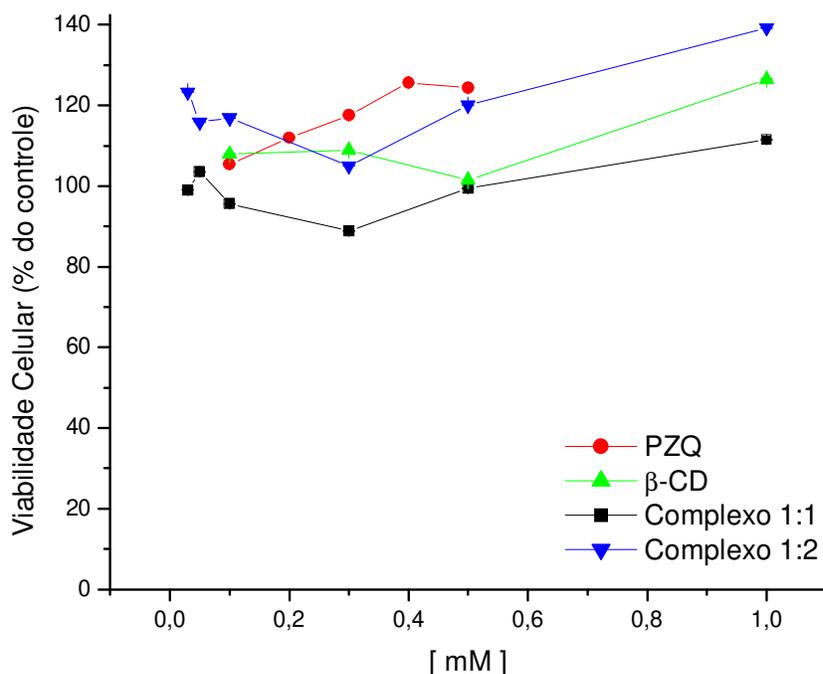


Figura 33 - Viabilidade celular avaliada através do MTT após 24h de tratamento com: PZQ (vermelho), $\beta\text{-CD}$ (verde) e os complexos de inclusão 1:1 (preto) e 1:2 (azul).

4.2. TESTES *IN VIVO*

4.2.1. SUSCEPTIBILIDADE DE *S. MANSONI* A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

Com o intuito de avaliar a atividade esquistossomicida do complexo de inclusão PZQ/ $\beta\text{-CD}$ (1:1) em relação ao PZQ puro, foi realizado o tratamento de camundongos infectados com a linhagem BH de *Schistosoma mansoni*. Como descrito no item 3.3.1 de

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Material e Métodos, no 71º dia de infecção os camundongos tratados foram sacrificados e a viabilidade dos vermes foi avaliada.

Os animais do grupo 1, tratados com salina, e do 2, tratados com β -CD, não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparamos o número de vermes vivos recuperados, demonstrando que o veículo (β -CD) não apresenta nenhum tipo de ação esquistossomicida.

Os animais do grupo 3, tratados com PZQ livre na dose 175 mg/kg, apresentaram diferenças significativas em relação aos dos grupos 1 ($p < 0,01$) e 2 com ($p < 0,05$). Assim, foi possível constatar a atividade esquistossomicida do PZQ, na dose terapêutica preconizada. Já para o grupo 4, com animais tratados com o complexo de inclusão PZQ/ β -CD (1:1), em uma concentração (810 mg/kg, equivalente àquela de PZQ) houve diferença significativa em relação aos dois grupos controle, com um valor de $p < 0,001$ em ambos os casos. Além disso, em relação ao tratamento com o PZQ livre foi obtida uma diferença na susceptibilidade dos esquistossomos ao tratamento com o complexo ($p < 0,05$; **Figura 34**), estatisticamente significativa.

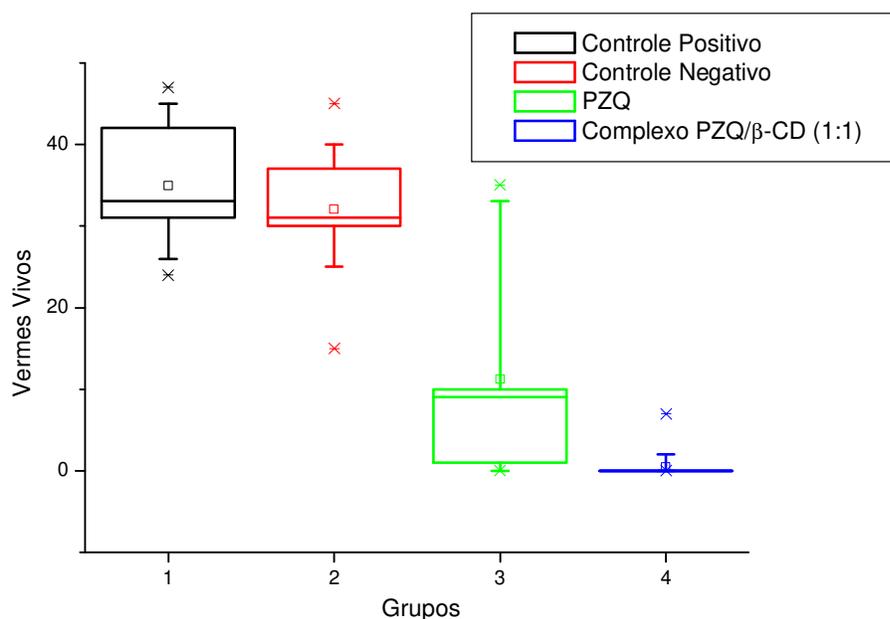


Figura 34 - Susceptibilidade de *Schistosoma mansoni* aos tratamentos com salina (Controle Positivo), β -CD (Controle Negativo), PZQ em solução aquosa (175 mg/kg) e o complexo de inclusão PZQ/ β -CD (810 mg/kg).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de isotermas de solubilidade mostrou que a β -CD foi capaz de aumentar a solubilidade do PZQ em 4 vezes. Outro trabalho na literatura demonstrou que o complexo de inclusão contendo piroxicam em β -CD aumentou em cerca de 5 vezes a solubilidade aquosa, em relação ao piroxicam livre e que esse aumento na solubilidade levou a um aumento na taxa de dissolução e em maiores níveis plasmáticos do fármaco (Davis & Brewster, 2004). Assim, acreditamos que o aumento da solubilidade do PZQ, conseguida com a formação do complexo de inclusão, seja responsável pela maior atividade farmacológica observada (diferença entre o grupo 4 e grupo 3, **Figura 34**).

O PZQ apresentou significativa queda de preço nos últimos anos, devido ao término da patente e a β -CD vem diminuindo seu preço devido ao aumento de sua produção e espera-se que continue caindo devido a quantidade de produtos contendo ciclodextrinas que a cada dia vem sendo inseridos no mercado mundial (Biber, 2002). A nova formulação do PZQ em β -CD, pode apresentar uma nova alternativa para o tratamento de esquistossomose, bem como outras doenças causadas por cestóides e trematódeos, uma vez que o aumento na solubilidade do fármaco, demonstrado na caracterização físico-química, refletiu em um aumento da atividade farmacológica do mesmo.

V. CONCLUSÕES

A caracterização do complexo de inclusão PZQ/ β -CD foi iniciada com cálculos de modelagem molecular e confirmada através das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, DSC, isotermas de solubilidade e RMN que, em conjunto, demonstraram que o sucesso da preparação, promovendo a inclusão molecular do PZQ.

A melhor estequiometria de formação do complexo foi 1:1 (PZQ/ β -CD) como prevista pelos cálculos de mecânica molecular e, posteriormente, confirmada através dos testes de isotermas de solubilidade e RMN.

Medidas de isotermas de solubilidade permitiram determinar um perfil do tipo A_L para a solubilidade do complexo de inclusão. Pudemos também determinar valores para a constante de associação do complexo de inclusão: $440,83 \text{ M}^{-1}$, medida pelas isotermas de solubilidade e $941,00 \text{ M}^{-1}$ por RMN valores estes que indicam que a interação entre o PZQ e a cavidade da ciclodextrina é forte o suficiente para modificar as propriedades físico-químicas do fármaco, como solubilidade, aqui demonstrada.

Os cálculos de Mecânica Molecular sugeriram uma geometria para o complexo de inclusão em que o anel isoquinolínico do PZQ estaria inserido na cavidade da β -CD. Este dado foi confirmado através dos resultados de ROESY, que inclusive detalharam o modo de inserção e a proximidade molecular entre hidrogênios do anel isoquinolínico com os hidrogênios H3 e H5 da cavidade da β -CD permitindo a proposição de um modelo molecular para o complexo (**Figura 32**).

O efeito tóxico *in vitro* do complexo PZQ/ β -CD foi avaliado por testes em culturas de fibroblastos V79 e os resultados demonstraram que nenhuma das formulações testadas: PZQ, β -CD e complexos de inclusão (1:1 e 1:2) apresentaram quaisquer índices de citotoxicidade.

Um aumento na solubilidade do PZQ de aproximadamente 4 vezes foi demonstrada pelos resultados das isotermas de solubilidade. Para avaliar se o aumento de solubilidade induziria aumento na biodisponibilidade do PZQ, foram realizados os testes *in vivo*.

Através de testes em camundongos infectados com a linhagem BH de *Schistosoma mansoni* demonstramos que o tratamento com a formulação do PZQ, contendo β -CD, aumenta ($p < 0,05$) a ação esquistossomicida do PZQ, em relação ao fármaco livre, efeito este relacionado ao aumento na biodisponibilidade do PZQ, quando veiculado pela β -CD.

V. CONCLUSÃO

Esses resultados permitiram propor o complexo PZQ/ β -CD (1:1) como uma nova formulação farmacêutica de maior eficácia que o PZQ livre (em doses equivalentes) ou com igual eficácia, mas com o uso de menores concentrações de PZQ.

VI. PERSPECTIVAS

O presente trabalho obteve sucesso na preparação do complexo de inclusão PZQ/ β -CD e os testes preliminares indicaram que uma diminuição na dose administrada obteve resultados satisfatórios, assim, uma formulação contendo PZQ e β -CD poderia ser escalonada. Uma possível utilização poderia ser como vermífugo para animais de companhia com a vantagem de, em menores doses, um menor volume seria necessário, o que facilitaria a administração.

Além da possível diminuição da dose utilizada a inclusão de PZQ em ciclodextrinas possibilitou o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica contendo PZQ em suspensão, o que pode ser muito interessante para formulações contendo outros excipientes capazes de mascarar o gosto desagradável do PZQ tornando-o mais palatável facilitando o uso pediátrico.

Devido à formação do complexo de inclusão com β -CD seria possível utilizar outras ciclodextrinas para o carreamento do PZQ, uma possibilidade seria a hidroxipropil- β -CD pois além de apresentar uma cavidade muito semelhante à da β -CD, possui uma solubilidade em água muito maior e vem tornando-se cada vez mais acessível economicamente.

Testes mais detalhados *in vivo* podem ser realizados analisando outros parâmetros e, além disso, testes em diferentes etapas do desenvolvimento do parasita, por exemplo no período em que o parasita permanece não susceptível ao tratamento (cerca de 4 semanas) convencional com o PZQ.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS P. (1985) PRAZIQUANTEL: MECHANISMS OF ANTI-SCHISTOSOMA ACTIVITY. PHARMACOL. THER. 29: 129-156.
- ARENA A.D. (1997) *SCHISTOSOMA MANSONI*: ATIVIDADE DE OXAMINIQUINE E PRAZIQUANTEL EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS LINHAGENS MAP E OUH *IN VIVO*. TESE DE MESTRADO, INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNICAMP, CAMPINAS.
- BALABAI N., LINTON A., NAPPER B., PRIYARDARSHY S., SUKHAREVSKY P., WALDECK D. H. (1998) ORIENTATIONAL DYNAMICS OF β -CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX. J. PHYS. CHEM. B 102: 9617-9624.
- BARBIC D.J., CASTRO E.A., ROSSI R.H. (2000) A MOLECULAR MECHANICS STUDY OF 1:1 COMPLEXES BETWEEN AZOBENZENE DERIVATIVES AND β -CYCLODEXTRIN. J. MOL. STRUCT. (THEOCHEM) 532: 171-181.
- BECKET G., SCHEP L. J., TAN M. Y. (1999) IMPROVEMENT OF THE *IN VITRO* DISSOLUTION OF PRAZIQUANTEL BY COMPLEXATION WITH α -, β - AND γ -CYCLODEXTRINS. INT. J. PHARM. 179: 65-71.
- BEKERS O., BEIJNEN J.H., OTAGIRI M., BULT A., UNDERBERG W.J. (1990) INCLUSION COMPLEXATION OF DOXORUBICIN AND DAUNORUBICIN WITH CYCLODEXTRINS. J. PHARM. BIOMED. ANAL. 8(8-12): 671-674.
- BEKERS O., UIJTENDAAL E.V., BEIJNEN J.H., BULT A., UNDERBERG W.J.M. (1991) CYCLODEXTRINS IN THE PHARMACEUTICAL FIELD. DRUG DEVELOP. IND. PHARM. 17: 1503-1549.
- BERGQUIST N.R., SCHISTOSOMIASIS: FROM RISK ASSESSMENT TO CONTROL, TRENDS IN PARASITOLOGY, 18(7): 309-314.
- BERTOLINI A.C., CEREDA M.P., CHUZEL G. (1998) FÉCULA E FARELO DE MANDIOCA COMO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS. CIÊNC. TECNOL. ALIMENT. 18(2): 224-229.
- BIBBY D.C., DAVIES N.M., TUCKER I.G. (2000) MECHANISMS BY WHICH CYCLODEXTRINS MODIFY DRUG RELEASE FROM POLYMERIC DRUG DELIVERY SYSTEMS. INT. J. PHARM. 197(1-2): 1-11.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIWER A., ANTRANIKIAN G., HEINZLE E. (2002) ENZIMATIC PRODUCTION OF CYCLODEXTRINS. *APPL. MICROBIOL. BIOTECNOL.* 59: 609-617.
- BLANCHARD T. J. (2004) SCHISTOSOMIASIS. *TRAVEL MED. INFECT. DIS.* 2: 5-11.
- BOLDRINI F. (2005) **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO MOLECULAR HIDROQUINONA/ β -CICLODEXTRINA E ESTUDO DE SEU POTENCIAL USO DERMATOLÓGICO.** TESE DE MESTRADO, UNESP, ARARAQUARA.
- BRITTO M.A.F.O., NASCIMENTO JR. C.S., DOS SANTOS E.H.F. (2004) ANÁLISE ESTRUTURAL DE CICLODEXTRINAS: UM ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS TEÓRICOS CLÁSSICOS E QUÂNTICOS. *QUÍM. NOVA* 27(6): 882-888.
- CAMARGO-NEVES, V. L. F. ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA. DISPONÍVEL EM <[HTTP://WWW.SUCEN.SP.GOV.BR/DOENCAS/INDEX.HTM](http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm)>. ACESSO EM 15 OUTUBRO DE 2005.
- CAMPBELL W.C., REW, R.S. (1986) CHEMOTHERAPY OF PARASITIC DISEASES. PLENUM PRESS, NEW YORK.
- CERVELLÓ E., MAZZUCCHI F., JAIME C. (2000) MOLECULAR MECHANICS AND MOLECULAR DYNAMICS CALCULATIONS OF THE [BETA]-CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES WITH M-, AND P-NITROPHENYL ALKANOATES. *J. MOL. STRUCT. (THEOCHEM)* 530(1-2): 155-163.
- CIOLI D., PICA-MATTOCCIA L. (2003) PRAZIQUANTEL. *PARASITOL. RES.* 90(0): S3-S9
- CIOLI D., PICA-MATTOCCIA L., ARCHER S. (1995) ANTICHISTOSOMAL DRUGS: PAST, PRESENT...AND FUTURE? *PHARMACOL THER.* 1: 35-85.
- COLES G.C., BRUCE J.I., KINOTI G.K., MUTAHI W.T., DIAS L.C., ROCHA R.S., KATZ N. (1987) THE POTENTIAL FOR DRUG RESISTANCE IN SCHISTOSOMIASIS. *PARASITOL. TODAY* 3(11): 349-50.
- CONCEIÇÃO M.J., ARGENTO C.A., CORRÊA A. (2000) STUDY OF *SCHISTOSOMA MANSONI* ISOLATES FROM PATIENTS WITH FAILURE OF TREATMENT WITH OXAMNIQUINE. *MEM. INST. OSWALDO CRUZ* 95(3): 375-380.
- COON D.R. (2005) SCHISTOSOMIASIS: OVERVIEW OF THE HISTORY, BIOLOGY, CLINICOPATHOLOGY, AND LABORATORY DIAGNOSIS. *CLIN. MICROBIOL. NEWSL.* 27(21): 163-168.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORREA D.H., MELO P.S., DE CARVALHO C.A., DE AZEVEDO M.B., DURAN N., HAUN M. (2005) DEHYDROCROTONIN AND ITS BETA-CYCLODEXTRIN COMPLEX: CYTOTOXICITY IN V79 FIBROBLASTS AND RAT CULTURED HEPATOCYTES. EUR. J. PHARMACOL. 510(1-2): 17-24.
- COULTER J.B.S. (2002) GLOBAL IMPORTANCE OF PARASITIC DISEASE. CURR. PAEDIATR. 12(7): 523-533.
- DAVIS A. (1993) ANTISCHISTOSOMAL DRUGS AND CLINICAL PRATICE, IN: PETER JORDAN, GERALD WEBBE & ROBERT STURROCK. (ORG.). HUMAN SCHISTOSOMIASIS. LONDRES, 1: 367-404.
- DAVIS M.E., BREWSTER M.E. (2004) CYCLODEXTRIN-BASED PHARMACEUTICS: PAST, PRESENT AND FUTURE. NAT. REV. DRUG DISCOV. 3: 1023-1035.
- DAYAN A.D. (2003) ALBENDAZOLE, MEBENDAZOLE AND PRAZIQUANTEL. REVIEW OF NON-CLINICAL TOXICITY AND PHARMACOKINETICS. ACTA TROP. 86(2-3): 141-159.
- DE AZEVEDO M.B.M., ALDERETE, J.B., LINO, A.C.S., LOH, W., FALJONI-ALARIO A., DURAN, N. (2000B) VIOLACEIN/BETA-CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX FORMATION STUDIED BY MEASUREMENTS OF DIFFUSION COEFFICIENT AND CIRCULAR DICHROISM. J. INCL. PHENOM. MACROCYCL. CHEM. 37(1-4): 67-74.
- DE AZEVEDO M.B.M., ALDERETE, J.B., RODRIGUEZ, J.A., SOUZA, A.O., RETTORI, D., TORSONI M.A., FALJONI-ALARIO A., HAUN M., DURAN, N. (2000A) BIOLOGICAL ACTIVITIES OF VIOLACEIN, A NEW ANTITUMORAL INDOLE DERIVATIVE, IN AN INCLUSION COMPLEX WITH BETA-CYCLODEXTRIN. J. INCL. PHENOM. MACROCYCL. CHEM. 37(1-4): 93-101.
- DE JESUS M.B., PINTO L.M.A., LINO A.C.S., TAKAHATA Y., FRACETO L.F., DE PAULA E. COMPOSTO DE INCLUSÃO ENTRE β -CICLODEXTRINA E PRAZIQUANTEL PARA TRATAMENTO DE ESQUISTOSSOMOSE. PROTOCOLADO NO INPI SOB N^o 1959 EM 20/04/2004.
- DE SOUZA A.A., LAVERDE JR. A. (2002) APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA ESTUDOS DE DIFUSÃO MOLECULAR EM LÍQUIDOS: A TÉCNICA DOSY. QUIM. NOVA 25(6): 1022-1026.
- DEL VALLE E.M.M. (2004) CYCLODEXTRINS AND THEIR USES: A REVIEW. PROCESS. BIOCHEM. 39: 1033-1046.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEROME A.E. (1987) MODERN NMR TECHNIQUES FOR CHEMISTRY RESEARCH. PERGAMON PRESS. NEW YORK.
- DUCHÊNE D., WOUESSIDJEWÉ D., PONCHAL G. (1999) CYCLODEXTRINS AND CARRIER SYSTEMS. *J. CONTROL. RELEASE* 62: 263-268.
- EL-ARINI S.K., LEUENBERGER H. (1998) DISSOLUTION PROPERTIES OF PRAZIQUANTEL-PVP SYSTEMS. *PHARM. ACTA HELV.* 73(2): 89-94.
- ERNST R.R., BODENHAUSEN G., WOKAUM A. (1986) PRINCIPLES OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE IN ONE AND TWO DIMENSIONS, CLARENDON PRESS, OXFORD.
- FRANK D.W., GRAY J.E., WEAVER R.N. (1976) CYCLODEXTRIN NEPHROSIS IN THE RAT. *AM. J. PATHOL.* 83: 367-382.
- FRENCH D. (1957) THE SCHARDINGER DEXTRINS. *ADV. CARBOHYDR. CHEM.* 12: 189-260.
- FRIJLINK H.W., VISSER J., HEFTING N.R., OOSTING R., MEIJER D. K. F., LERK C. F. (1990) THE PHARMACOKINETICS OF β -CYCLODEXTRIN IN THE RAT. *PHARM. RES.* 7: 9-16.
- FRÖMMING K.H., SZEJTLI J. (1994) TOPICS IN INCLUSION SCIENCE - CYCLODEXTRINS IN PHARMACY, 1ST ED, HUNGRIA, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS.
- GIL V.M.S., GERALDES C.F.G.C. (1987) RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, FUNDAÇÃO GALOUSTE GULBENKIAN, LISBOA.
- GIORDANO F., NOVAK C., MOYANO J.R. (2001) THERMAL ANALYSIS OF CYCLODEXTRINS AND THEIR INCLUSION COMPOUNDS. *THERMOCHIM. ACTA* 380(2): 123-151.
- GIORGI M., SALVATORI A.P., SOLDANI G., GIUSIANI M., LONGO V., GERVASI P.G., MENGOZZI G. (2001) PHARMACOKINETICS AND MICROSOMAL OXIDATION OF PRAZIQUANTEL AND ITS EFFECTS ON THE P450 SYSTEM IN THREE-MONTH-OLD LAMBS INFESTED BY *FASCIOLA HEPATICA*. *J. VET. PHARMACOL. THER.* 24(4): 251-259.
- GOODMAN A.G., GILMAN A.G. (1996) THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS , 9A ED. CD-ROM vs. 1.0, MCGRAW HILL.
- GÜNTHER H. (1994) NMR SPECTROSCOPY BASIC PRINCIPLES, CONCEPTS, AND APPLICATIONS IN CHEMISTRY, JOHN WILEY & SONS, NEW YORK.
- HAGAN P., APPLETON C.C., COLES G.C., KUSEL J.R., TCHUEM-TCHUENT L.-A. (2004) SCHISTOSOMIASIS CONTROL: KEEP TAKING THE TABLETS. *TRENDS. PARASITOL.* 20(2): 92-97.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HIGUCHI T., CONNORS K.A. (1965) PHASE-SOLUBILITY TECHNIQUES. ADV. ANAL. CHEM. INST. 4: 117-121.
- HILL J. (1956) CHEMOTHERAPEUTIC STUDIES WITH LABORATORY INFECTIONS OF *SCHISTOSOMA MANSONI*. ANN. TROP. MED. PARASITOL. 56: 39-48.
- HUGHES G.A. (2005) NANOSTRUCTURE-MEDIATED DRUG DELIVERY, NANOMEDICINE 1(1): 22-30.
- IDRO R., JENKINS N.E., NEWTON C.R.J.C. (2005) PATHOGENESIS, CLINICAL FEATURES, AND NEUROLOGICAL OUTCOME OF CEREBRAL MALARIA, THE LANCET NEUROLOGY 4(12): 827-840.
- IRIE T., UEKAMA K. (1997) PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF CYCLODEXTRINS. III. TOXICOLOGICAL ISSUES AND SAFETY EVALUATION. J. PHARM. SCI. 86(2): 147-162.
- JUNIOR A. L. (2001) **ESTUDOS DE RMN APLICADOS À QUÍMICA SUPRAMOLECULAR E DISCRIMINAÇÃO ENANTIOMÉRICA**. TESE DE DOUTORADO, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNICAMP, CAMPINAS.
- JURJIC B.S., ZDRAVKOVSKI Z., FRENCH A.D. (1996) MOLECULAR MODELING METHODOLOGY OF β -CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES. J. MOL. STRUCT. 366(1-2): 113-117.
- KASIM N.A., WHITEHOUSE M., RAMACHANDRAN C., BERMEJO M., LENNERNAS H., HUSSAIN A.S., JUNGINGER H.E., STAVCHANSKY S.A., MIDHA K.K., SHAH V.P., AMIDON G.L. (2003) MOLECULAR PROPERTIES OF WHO ESSENTIAL DRUGS AND PROVISIONAL BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION. MOL. PHARM. 1: 85-96.
- KATZ N., DIAS P., ARAUJO N., SOUZA C.P. (1973) ESTUDO DE UMA CEPA DE *SCHISTOSOMA MANSONI* RESISTENTE A AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS. REV. SOC. BRAS. MÉD. TROP. 7: 381-387.
- KING C.H., MAHMOUD A. A. (1989) DRUGS FIVE YEARS LATER: PRAZIQUANTEL. ANN. INTERN. MED. 110: 290-196.
- KURODA Y., KITAMURA K. (1984) INTRA- AND INTERMOLECULAR ^1H - ^1H NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT STUDIES ON THE INTERACTIONS OF CHLORPROMAZINE WITH LECITHIN VESICLES. J. AM. CHEM. SOC. 106: 1-6.
- LEOPOLD G., UNGETHÜM W., GROLL E., DIEKMAN H.W., NOWAK H., WEGNER D.H.G. (1978) CLINICAL PHARMACOLOGY IN NORMAL VOLUNTEERS OF PRAZIQUANTEL, A

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NEW DRUG AGAINST SCHISTOSOMES AND CESTODES. EUR. J. CLIN. PHARMAC. 14: 181-191.
- LINO A.C.S., ALDERETE J., TAKAHATA Y. (1999) ASPECTOS COMPUTACIONAIS E ESTRUTURAIS DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE 6-MERCAPTOPURINA E β -CICLODEXTRINA. XI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE QUÍMICA TEÓRICA, POÇOS DE CALDAS, MG, BRASIL.
- LINO A.C.S., TAKAHATA Y., JAIME C. (2002) α - AND β -CYCLODEXTRIN COMPLEXES WITH N-ALKYL CARBOXYLIC ACIDS AND N-ALKYL P-HYDROXY BENZOATES. A MOLECULAR MECHANICS STUDY OF 1:1 AND 1:2 ASSOCIATIONS. J. MOL. STRUCT. (THEOCHEM) 594(3): 207-213.
- LOFTSSON T., BREWSTER M.E. (1996) PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF CYCLODEXTRINS. 1. DRUG SOLUBILIZATION AND STABILIZATION. J. PHARM. SCI. 85(10): 1017-1025.
- LOUKAS Y.L., VRAKA V., GREGORIADIS G. (1998) DRUGS, IN CYCLODEXTRINS, IN LIPOSOMES: A NOVEL APPROACH TO THE CHEMICAL STABILITY OF DRUGS SENSITIVE TO HYDROLYSIS. INT. J. PHARM., 162(1-2): 137-142.
- MAGALHÃES L.A. (INSTITUTO DE BIOLOGIA - DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA) COMUNICAÇÃO PESSOAL. CAMPINAS, 2005.
- MCMANUS D.P., BARTLEY P.B. (2004) A VACCINE AGAINST ASIAN SCHISTOSOMIASIS, PARASITOLOGY INTERNATIONAL, 53(2): 163-173.
- MONTRESOR A., ODERMATT P., MUTH S., IWATA F., RAJA'A Y.A., ASSIS A.M., ZULKIFLI A., KABATEREINE N.B., FENWICK A., AL-AWAIDY S. (2005) THE WHO DOSE POLE FOR THE ADMINISTRATION OF PRAZIQUANTEL IS ALSO ACCURATE IN NON-AFRICAN POPULATIONS. TRANS. R. SOC. TROP. MED. HYG. 99(1): 78-81.
- MORRIS K.F., JOHNSON JR.C.S. (1992) DIFFUSION-ORDERED TWO-DIMENSIONAL NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. J. AM. CHEM. SOC.; 114(8): 3139-3141.
- MOURÃO S.C., COSTA P.I., SALGADO H.R.N., GREMIÃO M.P.D. (2005) IMPROVEMENT OF ANTISCHISTOSOMAL ACTIVITY OF PRAZIQUANTEL BY INCORPORATION INTO PHOSPHATIDYLCHOLINE-CONTAINING LIPOSOMES. INT. J. PHARM. 295(1-2): 157-162.
- OLIVER L., STIREWALT M.A. (1952) AN EFFICIENT METHOD FOR EXPOSURE OF MICE TO CERCARIE OF *SCHISTOSOMA MANSONI*. J. PARASITOL. 38: 19-32.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE) (MAIO DE 1996) FACT SHEET Nº 115, SCHISTOSOMIASIS IN [HTTP://WWW.WHO.ORG](http://www.who.org).
- PANNIER A.K., SHEA L.D. (2004) CONTROLLED RELEASE SYSTEMS FOR DNA DELIVERY. *MOL. THER.* 10(1): 19-26.
- PARAENSE W.L. (1959) HISTÓRICO [ESQUISTOSSOMOSE MANSONI]. *REV. BRAS. MALARIOL. DOENÇAS TROP.* 11(2-3): 105-117.
- PATZSCHKE K., PÜTTER J., WEGNER L. A., HORSTER F. A., DIEKMANN H. W. (1979) SERUM CONCENTRATIONS AND RENAL EXCRETION IN HUMANS AFTER ORAL ADMINISTRATION OF PRAZIQUANTEL-RESULTS OF THREE DETERMINATION METHODS. *EUR. DRUG METAB. PHARMACOKIN.* 4: 149-156.
- PAVIA D.L., LAMPMAN G.M., KRIZ G.S. (1996) INTRODUCTION TO SPECTROSCOPY: A GUIDE FOR STUDENTS OF ORGANIC CHEMISTRY, SAUNDERS COLLEGE PUBLISHING, ORLANDO.
- PAX R., BENNETT J.L., FETTERER R. (1978) A BENZODIAZEPINE DERIVATIVE AND PRAZIQUANTEL: EFFECTS ON MUSCULATURE OF *SCHISTOSOMA MANSONI* AND *SCHISTOSOMA JAPONICUM*. *NAUNYN SCHMIEDEBERGS ARCH. PHARMACOL.* 304(3): 309-315.
- PÉCOUL B., CHIRAC P., TROUILLE P., PINEL J. (1999) ACCESS TO ESSENTIAL DRUGS IN POOR COUNTRIES. A LOST BATTLE? *J. AM. MED. INFORM. ASSN.* 281: 361-367.
- PINTO L.M.A. (2002) **DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES ANESTÉSICAS LOCAIS DE LONGA DURAÇÃO**. TESE DE DOUTORADO, INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNICAMP, CAMPINAS.
- PINTO L.M.A., DE JESUS M.B., DE PAULA E., LINO A.C.S., ALDERETE J.B., DUARTE H.A., TAKAHATA Y. (2004) ELUCIDATION OF INCLUSION COMPOUNDS BETWEEN [BETA]-CYCLODEXTRIN/LOCAL ANAESTHETICS STRUCTURE: A THEORETICAL AND EXPERIMENTAL STUDY USING DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY AND MOLECULAR MECHANICS. *J. MOL. STRUCT. (THEOCHEM)* 678(1-3): 63-66.
- PRATA A. (1991) ESQUISTOSSOMOSE MANSONI, IN: DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS, (VERONESI R.) CAP. 100, 8A ED., GUANABARA KOOGAN, RIO DE JANEIRO.
- RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M., MOORE P.K. (2004) FARMACOLOGIA. 5 ED. ELSEVIER.
- REY L. BASES DA PARASITOLOGIA MÉDICA (2002) 2. ED., GUANABARA-KOOGAN, RIO DE JANEIRO.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RICHTER J. (2003) THE IMPACT OF CHEMOTHERAPY ON MORBIDITY DUE TO SCHISTOSOMIASIS. ACTA TROP. 86(2-3): 161-183.
- SAHOO S.K., LABHASETWAR V. (2003) NANOTECH APPROACHES TO DRUG DELIVERY AND IMAGING, DRUG DISCOV. TODAY, 8(24): 1112-1120.
- SCHEPMANN D., BLASCHKE G. (2001) ISOLATION AND IDENTIFICATION OF 8-HYDROXYPRAZIQUANTEL AS A METABOLITE OF THE ANTISCHISTOSOMAL DRUG PRAZIQUANTEL. J. PHARM. BIOMED. ANAL. 26(5-6): 791-799.
- SCHNEIDER H.J., HACKET F., RUDIGER V., IKEDA H. (1998) NMR STUDIES OF CYCLODEXTRINS AND CYCLODEXTRIN COMPLEXES. CHEM REV. 98(5): 1755-1786.
- SCHNEIDERMAN E., STALCUP A.M. (2000) CYCLODEXTRINS: A VERSATILE TOOL IN SEPARATION SCIENCE. J. CHROMATOGR. B. BIOMED. SCI. APPL. 745(1): 83-102.
- SILVERSTEIN R.M., BASSLER G.C., MORRILL T.C. (1991) SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS, JOHN WILEY & SONS INC., SINGAPORE.
- SINGH M., SHARMA R., BANERJEE U.C. (2002) BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF CYCLODEXTRINS. BIOTECHNOL. ADV. 20: 341-359.
- SPAMER E., MULLER D.G., WESSELS P.L., VENTER J.P. (2002) CHARACTERIZATION OF THE COMPLEXES OF FUROSEMIDE WITH 2-HYDROXYPROPYL-BETA-CYCLODEXTRIN AND SULFOBUTYL ETHER-7-BETA-CYCLODEXTRIN. EUR. J. PHARM. SCI. 16(4-5): 247-53.
- STELLA V.J., RAO V.M., ZANNOU E.A., ZIA V. (1999) MECHANISMS OF DRUG RELEASE FROM CYCLODEXTRIN COMPLEXES. ADV. DRUG DELIVER. REV. 36: 3-16.
- SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN) DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.SUCEN.SP.GOV.BR/](http://www.sucen.sp.gov.br/)>. ACESSADO EM 03/08/2005.
- SZEJTLI J. (1998) INTRODUCTION AND GENERAL OVERVIEW OF CYCLODEXTRIN CHEMISTRY. CHEM. REV. 98: 1743-1753.
- SZEJTLI J. (1998B) CYCLODEXTRIN TECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT.
- UEKAMA K. (2004) DESIGN AND EVALUATION OF CYCLODEXTRIN-BASED DRUG FORMULATION. CHEM. PHARM. BULL. 52(8): 900-915.
- UEKAMA K., HIRAYAMA F., IRIE T. (1998) CYCLODEXTRIN DRUG CARRIER SYSTEMS. CHEM. REV. 98: 2045-2076.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VEIGA F.J., FERNANDES C.M., CARVALHO R.A., GERALDES C.F. (2001) MOLECULAR MODELLING AND ¹H-NMR: ULTIMATE TOOLS FOR THE INVESTIGATION OF TOLBUTAMIDE: BETA-CYCLODEXTRIN AND TOLBUTAMIDE: HYDROXYPROPYL-BETA-CYCLODEXTRIN COMPLEXES. CHEM. PHARM. BULL. 49(10): 1251-6.
- VERJOVSKI-ALMEIDA S., DEMARCO R. (2004) GENOMA CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE, DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW2.UOL.COM.BR/SCIAM/CONTEUDO/MATERIA/MATERIA_54.HTML](http://www2.uol.com.br/sciam/conteudo/materia/materia_54.html). ACESSO EM: 10/12/2005.
- WANG F. -X., ZHU Y, -Q., YAO Q, -S., YAN H. -Y., PAN S. -G., LI W. -Y. & FENG Y. -Y. (1983) EFFECT IN VITRO OF METABOLITES OF PRAZIQUANTEL ON *SCHISTOSOMA JAPONICUM*. ACTA PHARMAC. SIN. 4: 45-48.
- WEBBE G., STURROCK R. F. (1993). HUMAN SCHISTOSOMIASIS, 3 ED, WALLINGFORD, UK CAMBRIDGE: CAB INTERNATIONAL.
- WIMMER R., AACHMANN F.L., LARSEN K.L., PETERSON S.B. (2002) NMR DIFFUSION AS A NOVEL TOOL FOR MEASURING THE ASSOCIATION CONSTANT BETWEEN CYCLODEXTRIN AND GUEST MOLECULES. CARBOHYD. RES. 337(9): 841-849.
- XIAO S.H., CATTO B.A. (1989) COMPARATIVE IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITY OF RACEMIC PRAZIQUANTEL AND ITS LEVOROTATED ISOMER ON *SCHISTOSOMA MANSONI*. J. INFECT. DIS. 159: 589-592.
- YOLLES T.K., MOORE P.V., DEGENSTI D.L., RIPSON C.A., MELENEY H.E. (1947) A TECHNIQUE FOR THE PERFUSION OF LABORATORY ANIMALS FOR THE RECOVERY OF SCHISTOSOMES. J. PARASITOL. 33: 419-426.