



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTIPARTICULADOS PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

IHATANDESON ALVES DA SILVA

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

IHATANDESON ALVES DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTIPARTICULADOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho

Brasília/DF
2014

Ihatanderson

Alves

da Silva

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTIPARTICULADOS PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS



BRASÍLIA
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves-Silva, Ihatanderson

Desenvolvimento de sistemas
multiparticulados para o tratamento da
Doença de Chagas / por Ihatanderson Alves
da Silva, 2014

55 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Sérgio
Soares da Cunha Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade
de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde,
2014.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES-SILVA, I. Desenvolvimento de sistemas multiparticulados para o tratamento da Doença de Chagas. Brasília: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014, XX f, Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Ihatanderson Alves da Silva

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de sistemas multiparticulados para o tratamento da Doença de Chagas

GRAU: Mestre

ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Nome: Ihatanderson Alves da Silva

e-mail: ihatanderson.silva@anvisa.gov.br

IHATANDERSON ALVES DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTIPARTICULADOS PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Comissão Avaliadora composta pelos membros:

COMISSÃO AVALIADORA

Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho – Universidade de Brasília - (Faculdade de Ciências da Saúde) Presidente

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso - Universidade de Brasília - (Faculdade de Ciências da Saúde)
Membro titular

Prof.^a Dr.^a Livia Cristina Lira de Sá Barreto - Universidade de Brasília - (Faculdade de Ceilândia)
Membro titular

Prof.^a Dr.^a Tais Gratieri - UnB (Faculdade de Ciências da Saúde)
Membro suplente

Data da avaliação: 07 de junho de 2014.

Local de defesa: Sala nº 05, Faculdade de Ciências da Saúde – Brasília – DF.

Dedico este trabalho a todos aqueles que confiam no SENHOR, que se abalam,
mas permanecem para sempre.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por mais uma oportunidade.

Aos meus pais, Lourdes e João (*in memoriam*), por aceitarem a difícil missão de me educar, por fazer de mim uma pessoa melhor e pelo exemplo de vida a seguir.

A minha irmã, Gelda, pela paciência em escutar e pelo suporte fraternal que é incomparável, inenarrável e insubstituível.

A minha esposa, Babi, pelo ouvido, pelo companheirismo e pela atenção que sempre me motiva.

Ao Professor Marcílio, por me incumbiu de tarefa tão importante na busca de elementos científicos para o melhoramento da vida dos negligenciados. Pela paciência, insistência e esforço. Se eu tivesse a metade de sua empolgação e ânimo, com certeza seria uma pessoa melhor.

À Professora Eliana Martins Lima, pelo suporte intelectual e técnico que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas Patrícia, Diegue, Rachel, Ludmila, Michele e demais colaboradores do Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Unb. Que me suportaram e me ensinaram a ser humilde durante todo o tempo do trabalho.

Aos colegas Letícia, Marcos Junior, Marilisa e demais colaboradores do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – FARMATEC da Universidade Federal de Goiás. Pelos ensinamentos, dicas e confiança.

Aos colegas e chefes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária pelo patrocínio e apoio administrativo nesta jornada.

Ao Marcos Pereira. Colega farmacêutico cujo suporte e apoio intelectual foram essenciais, sem os quais este trabalho não teria ocorrido.

E a Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas e todos os colaboradores que permitiram a execução deste trabalho.

“Ainda teimo, mas não aguento mais. O médico disse que meu coração está bem estragado.”

(Régio Pereira da Silva, 57 anos, em entrevista ao jornal “*Correio Brasiliense*” em 05/02/2012).

RESUMO

ALVES-SILVA, I. Desenvolvimento de sistemas multiparticulados para o tratamento da Doença de Chagas. Brasília: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014, 55 f, Dissertação de Mestrado.

A doença de Chagas, considerada uma doença negligenciada, apresenta-se como um importante problema de saúde pública, afetando aproximadamente 8 milhões de pessoas, em 21 diferentes países do mundo. Apesar de sua importância, a doença de Chagas não possui um tratamento medicamentoso eficaz, especialmente na sua fase crônica. Uma das alternativas mais promissoras para o tratamento dos pacientes chagásicos pode estar na quimioterapia combinada, com destaque para o efeito sinérgico encontrado entre benznidazol (BNZ) e outros derivados azólicos, como itraconazol (ITZ). Neste contexto, a utilização de sistemas multiparticulados, como péletes, fornece uma grande flexibilidade na combinação de diferentes dosagens dos fármacos e constituem sistemas muito adequados para a modificação de sua liberação. Este trabalho teve como objetivo a elaboração de péletes de BNZ e ITZ por extrusão-esferonização para o tratamento da doença de Chagas em terapia dose fixa combinada. Os estudos de compatibilidade realizados utilizando análise térmica e outros ensaios auxiliares evidenciaram a compatibilidade de ITZ com os excipientes MgST, ciclodextrinas, MCC e NaCrosco, enquanto que o BNZ mostrou-se compatível com os materiais CMC, NaCrosco, NaGlico e PEG. Em contrapartida, as associações de ITZ com PVP e HPMC são incompatíveis e potencialmente instáveis. Os estudos de compatibilidade conduzidos entre os fármacos BNZ e ITZ mostraram forte interação física com repercussões na estabilidade química desses compostos. Esse resultado condicionou o processamento farmacêutico utilizado na sequência do estudo, optando-se por elaborar péletes de cada um dos fármacos separadamente. Os péletes de BNZ e ITZ foram elaborados utilizando os fármacos na forma de micropartículas, de forma a otimizar a sua dissolução. Os péletes de microcristais de BNZ apresentaram características físico-químicas apropriadas, formato cilíndrico, excelentes propriedades de fluxo e rápida desintegração e dissolução. O uso de NaCrosco e PEG demonstrou um bom desempenho em promover uma rápida desintegração desses péletes. Os péletes elaborados com microcristais de ITZ mostraram igualmente características físico-químicas e farmacopeicas adequadas, apresentando desintegração praticamente instantânea, devido ao elevado percentual de NaCrosco na formulação. Dessa forma, o estudo conduzido obteve êxito em desenvolver sistemas multiparticulados de BNZ e ITZ que podem ser facilmente combinados em diferentes proporções, possibilitando estudos futuros em terapia dose fixa combinada para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Benznidazol. Itraconazol. Sistemas multiparticulados. Microcristais. Péletes. Extrusão. Esferonização.

ABSTRACT

ALVES-SILVA, I. Desenvolvimento de sistemas multiparticulados para o tratamento da Doença de Chagas. Brasília: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014, XX f, Dissertação de Mestrado.

Chagas' disease, considered as neglected disease, appears to be an important health problem, affecting approximately 8 million of persons in 21 different countries in the world. Despite the importance, Chaga's disease does not have an effective pharmaceutical treatment for chronic phase. One of the most promising treatment alternatives for chagasic patients can be related to the combined chemotherapy, specially highlighted by the synergic effect achieved of benznidazole (BNZ) and other Azole derivate coumpound, as itraconazole (ITZ). In this context, the use of multiparticulate systems, like pellets, provides much more flexibility for different drug dosage combinations and creates most adequate systems with modified release profiles. This study had the objective of design of pellets compound of BNZ and ITZ, produced by extrusion-spheronisation process for Chagas' disease with combined fix therapy. The compatibilities studies utilizing thermo analysis and other auxiliary tests showed compatibility between ITZ and other excipients, as MgSt, cyclodextrins, MCC, NaCros, meanwhile BNZ showed to be compatible with MCC, NaCros, NaGlico and PEG. On other hand, the associations of ITZ with PVP and HPMC are incompatible and potentially instable. The compatibility assays showed high physical interaction between BNZ and ITZ and may reverberate over the chemical stability of these compounds. This evidence delimited the pharmaceutical processing over the study sequence, making the choice of the pellet formulation of each one drug in separate. The BNZ and ITZ pellets were formulated in micro particulate forms to optimize the dissolution profiles. The BNZ microcrystal pellets showed appropriated physical-chemical characteristics, cylindrical shapes, excellent flow properties and fast disintegrations and dissolution profiles. The addition of NaCros and PEG in pellets showed excellent performance promoting fast disintegration. As well, The ITZ microcrystal pellets showed adequate physical-chemical and pharmacopeia characteristics, exhibiting practically instantaneous disintegration due elevated percentage of NaCros in the formulation. In this manner, the present study succeeded in developing multiparticulate systems of BNZ an ITZ, which can be easily combined in different proportions, allowing further studies in combined fix dosage therapy for Chagas' disease treatment.

Keywords: Benznidazole. Itraconazole. Multiparticulate systems. Microcrystals. Pellets. Extrusion. Spheronization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Amostras fotosensibilizadas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β CD	Beta-ciclodextrina
BCS	Biopharmaceutical Classification System
BNZ	Benznidazol
CMC	Celulose microcristalina
CroscNa	Croscarmelose sódica
DNDi	Drugs for Neglected Disease Initiative
DSC	Differential scanning calorimetry
dt	Tap density
db	Bulk density
DTG	Derivative thermogravimetry
FTIR	Fourier Transform Infra Red
GlicoNa	Glicolato amido de sódio
HM	Heated mixture
HP β CD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IC	Índice de Compressibilidade
ITZ	Itraconazol
MCC	Microcrystalline cellulose
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mistura física
MA	Mistura aquecida
MU	Mistura umedecida
MgSt	Estearato de Magnésio
NaCrosc	Croscarmelose sódica
NaGlico	Glicolato amido de sódio
Log _{pow}	Coefficiente de partição octanol-água
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial de hidrogênio
pKa	Cologarítimo da Constante de Acidez
PM	Physical mixture
PS	Photo stressed sample
PVP	Polivinilpirrolidona
RM β CD	Beta-ciclodextrina metilada randomizada
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
UFG	Universidade Federal de Goiás
UnB	Universidade de Brasília
WHO	World Health Organization
WM	Wet Mixture

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1	Tratamento medicamentoso convencional	6
2.3.	Tratamento medicamentoso inovador: combinações de ITZ e BNZ	7
2.4.	Estudos de pré-formulação	8
2.5.	Melhoramento das formas farmacêuticas	10
3.	OBJETIVOS	15
3.1.	Objetivos específicos	15
4.	CAPÍTULO 1: Estudos de preformulação de Itraconazol associado com Benznidazol e excipientes farmacêuticos	16
5.	CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de péletes de BNZ preparados por extrusão-esferonização para melhoramento do seu perfil de dissolução	32
6.	CAPÍTULO 3: Obtenção de péletes a partir de microcristais de itraconazol para tratamento da doença de Chagas	43
7.	CAPÍTULO 4: Estudos de compatibilidade térmica de itraconazol, benznidazol e excipientes farmacêuticos	52
8.	CAPÍTULO 5: Termogravimetria isotérmica para determinação da estabilidade de itraconazol e benznidazol	55
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	
	ANEXO 1	

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana é uma doença parasitária causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (**Figura 1**). Esta doença se apresenta como um importante problema de saúde pública na América Latina e sua morbidade e mortalidade são problemas de saúde que mais afligem países em desenvolvimento, afetando cerca de 8 milhões de pessoas em 21 diferentes países. Devido às migrações populacionais, esta doença foi disseminada para países desenvolvidos não endêmicos, apresentando novos desafios aos seus sistemas de saúde (WHO, 2014; RASSI *et al.*, 2010; MOTT, 1990; SCHMUNIS, 1991; GASCON *et al.*, 2010; BERN *et al.*, 2009).

O modo predominante de transmissão desta doença ocorre pela transmissão vetorial por meio da penetração do *T. cruzi* provenientes das fezes depositadas pelo hospedeiro invertebrado na circulação sanguínea nos seres humanos. Os outros modos de transmissão são via transfusão sanguínea, (SCHMUNIS, 1999), transmissão congênita (TORRICO *et al.*, 2004), transplantes de órgãos (ALTCLAS, *et al.*, 2005) e por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados (NÓBREGA *et al.*, 2009).

O inseto vetor é pertencentes à família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, sendo que, os principais transmissores são o *Panstrongylus megistus*, o *Triatoma infestans* e o *Rhodnius prolixus* (CEBALLOS *et al.*, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2006). No Brasil existem pelo menos 44 espécies de vetores, destas, cinco são consideradas domésticas e, portanto, de maior importância epidemiológica: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (COURA, 2002). Os triatomíneos são conhecidos popularmente pelo nome de barbeiro, fincão, chupança, percevejos e baratas-d'água (**Figura 2**) (DANTAS *et al.*, 2006).

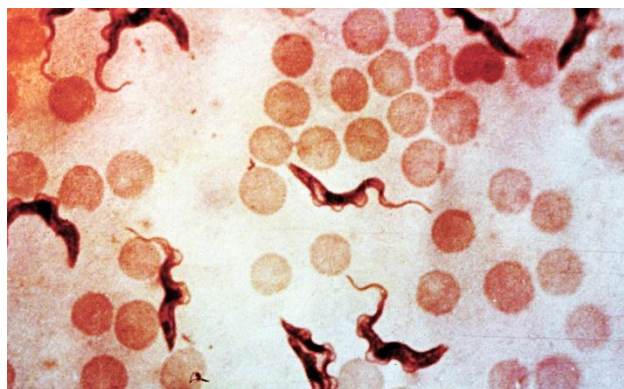


Figura 1: Esfregaço sanguíneo contendo *T. Cruzi*. (50X)
Fonte: REY, Parasitologia 2ª Edição.

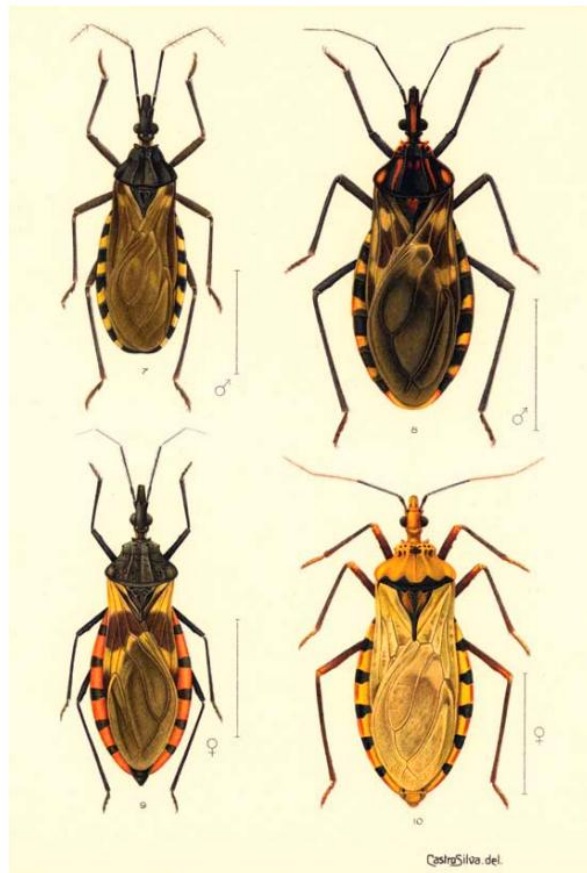


Figura 2: Representações feitas por Castro Silva: (da esquerda para direita e de cima para baix) *Triatoma infestans*; *Triatoma vitticeps*; *Triatoma dimidiata*; *Panstrongylus geniculatus*.

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda inicia-se com as manifestações clínicas de sinais de entrada do parasita no organismo e pode persistir por até 2 meses, apresentando-se de forma sintomática ou assintomática, dependendo do estado imunológico do indivíduo. Dentre os sinais de porta de entrada, o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação (**Figura 3**) podem oferecer fortes indícios de infecção por *T. cruzi*. O sinal de Romaña apresenta-se como uma inflamação na região ocular, caracterizado por edema bípalebral e unilateral. Ao passo que o chagoma de inoculação mostra-se como uma erupção cutânea provocada pela reação imune a picada do vetor e a introdução das formas infectantes (BARRETT *et al.*, 2003).

A fase aguda da doença é caracterizada por manifestações com diferentes intensidades. Em crianças e pacientes imunodeprimidos, a fase aguda sintomática pode muitas vezes ser

fatal devido a casos de meningo-encefalite e, mais raramente, a miocardite aguda difusa. Os principais sintomas dessa fase são febre, edema, poliadenia, complicações cardíacas, hepatoesplenomegalia e perturbações neurológicas (LANA; TAFURI, 2002). Nesta fase a mortalidade causada principalmente pela elevada parasitemia é de cerca de 10% (COURA *et al*, 2002).

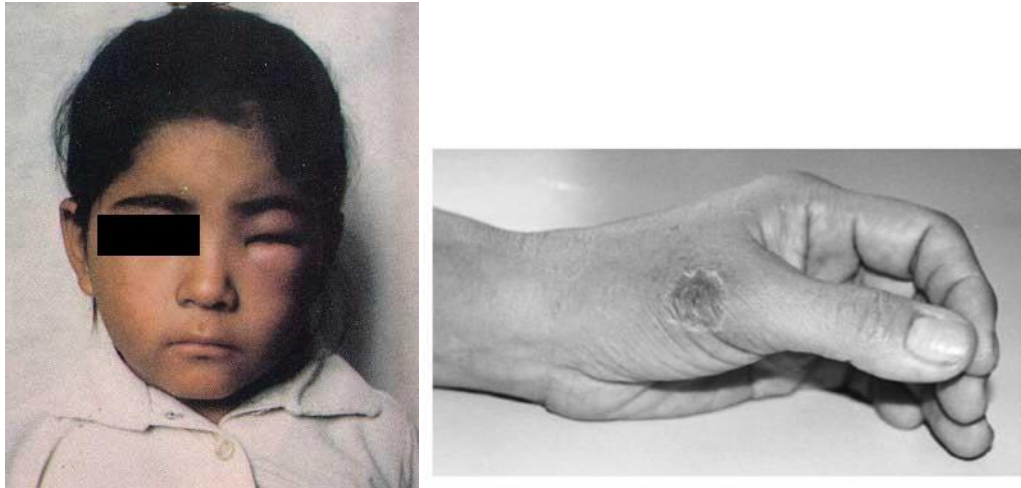


Figura 3: Fotografia de criança com Sinal de Romaña (à esquerda). Chagoma de inoculação (à direita) Fonte: REY, Parasitologia 2ª Edição.

A fase crônica pode ser sintomática ou assintomática, como ocorre na maioria dos casos e por isso denominada forma indeterminada, podendo permanecer assim por tempo indefinido. Cerca de 30% a 40% dos indivíduos infectados evoluem para as formas sintomáticas cardíacas e/ou digestivas da doença em um período variável de 10 a 30 anos. A sintomatologia relacionada aos problemas cardíacos envolve insuficiência congestiva e alterações eletrocardiográficas. Já os problemas relacionados à infecção ao trato digestivo se caracterizam em alterações morfológicas e funcionais do esôfago e do cólon, levando a dificuldade na deglutição e defecação. Sendo assim, devido aos sintomas que reduzem a capacidade produtiva das pessoas, perdas com produtividade são estimadas em cerca de U\$ 1,2 bilhões, isto sem incluir os elevados gastos com despesas médicas (PRATA, 2001; GUEDES, 2009).

Apesar de ter sido descoberta há mais de 100 anos, a doença de Chagas não possui um tratamento medicamentoso eficaz, especialmente na fase crônica da doença. Diversas tentativas de desenvolvimento de tratamento foram realizadas nos últimos anos, todavia o

tratamento farmacológico da doença foi muito pouco alterado nos últimos 40 anos (HONORATO, 2014). Os dois principais fármacos utilizados para o tratamento foram apresentados nos anos 60 (nifurtimox, Bayer) e 70 (benznidazol, Roche).

Alguns estudos demonstraram que esses tratamentos são eficazes em recém-nascidos de 0 a 6 meses que adquiram a doença por via congênita (com mais de 99% de cura) e na fase aguda (com mais de 80% de cura). Contudo, suas maiores limitações estão associadas ao uso na fase crônica da doença na qual a cura medicamentosa é inferior a 20% dos pacientes adultos (LANA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2009; BURGOS *et al.*, 2009), muito embora haja relatos de sucesso entre 60 e 90% de cura em crianças de 0 a 14 anos (ANDRADE *et al.*, 2004).

Outros estudos clínicos demonstraram que a eficácia do tratamento varia de acordo com a fase clínica da doença, a dose, o tempo de tratamento, a idade, a origem do paciente e o método de avaliação da eficácia (GUEDES *et al.*, 2006; PALMEIRO-ROLDAN *et al.*, 2014).

O nifurtimox (Lampit[®]), cuja produção e comercialização no Brasil foi descontinuada na década de 80, é um derivado nitrofurano que tem o mecanismo de ação envolvido na formação de radicais nitroânios pelas nitroredutases, levando a radicais oxigenados altamente tóxicos (CASTRO, *et al.*, 2002; DOCAMPO, 1990). Já o benznidazol (Rochagran[®]) possui mecanismo de ação envolvendo ligações covalentes com DNA, lípidos e proteínas do *Trypanosoma cruzi*. (DOCAMPO, 1990).

Ambos os fármacos apresentam propriedades farmacocinéticas desfavoráveis e os efeitos adversos dos medicamentos levam a um resultado terapêutico pouco satisfatório, com baixa adesão ao tratamento.

A busca por novos medicamentos para o tratamento desta doença realizadas exclusivamente por instituições governamentais e utilizando recursos públicos tem apresentado algumas alternativas promissoras. A pesquisa por uma terapia racional para o *T. cruzi* inclui inibidores do metabolismo de tripanotona, inibidores da enzima cisteína-protease, inibidores da síntese de fosfolípidos, inibidores do metabolismo de pirofosfato, drogas naturais e inibidores da síntese de ergosterol (APT, 2010).

Dentre estas pesquisas, destaca-se o efeito sinérgico observado pelo uso da terapia combinada de inibidores da síntese de ergosterol, exemplificados nos derivados azólicos

itraconazol, posaconazol e ravuconazol com o benznidazol (URBINA *et al*, 2009). O uso destas terapias combinadas apresenta uma alternativa bastante viável por envolver a utilização de medicamentos já existentes no mercado, ou seja, que possuem sua segurança e toxicidade conhecidas, permitindo reduzir os custos e o tempo gastos nas pesquisas. Neste mesmo plano, a estratégia de se criar uma terapia dose fixa combinada tem sido aplicada para avaliar a atuação dos fármacos em diferentes substratos, diminuir as quantidades administradas e reduzir os efeitos tóxicos e a resistência ao tratamento (FRANCISCO *et al*, 2008; DIAS *et al*, 2009; VIVAS *et al*, 2008).

Paralelamente, o desenvolvimento de dispositivos terapêuticos farmacotecnicamente elaborados, capazes de modular a liberação de fármacos e que possibilitam a combinação de diferentes fármacos em um mesmo medicamento, como por exemplo, péletes, pode trazer interessantes perspectivas para o tratamento da doença de Chagas. Isto porque este sistema multiparticulado apresenta ótimas propriedades de escoamento, estreita distribuição de tamanho de partículas, superfície susceptível ao revestimento por película para à proteção entérica ou à liberação controlada ou sustentada. Similarmente, os péletes permitem a incorporação de grande quantidade de substância ativa, mesmo que incompatíveis, numa mesma forma farmacêutica, além de apresentar grande dispersão no trato gastrointestinal e conseqüente redução da irritação do trato por fármacos gastro-irritantes com baixo risco de efeitos adversos por superdosagem (SANTOS, 2004).

Neste sentido, o desenvolvimento de um sistema multiparticulado, utilizando tecnologia de peletização consagrada para formulação de péletes de liberação acelerada, incorporando benznidazol e itraconazol em doses fixas e combinadas se tornou o objetivo deste trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tratamento medicamentoso convencional

Muito embora seja um dos fármacos mais efetivos já estudados, o Nifurtimox já não é mais utilizado na terapia anti-Chagas no Brasil desde a caducidade do registro do medicamento no Ministério da Saúde em 1989 (DOCAMPO, 1990; ANVISA, 2014). Este medicamento é capaz de induzir a produção de gás oxigênio pelas células mitocondriais do *T. cruzi* para o início da difusão de peróxido de hidrogênio nas demais células do parasita, causando assim sua morte (DOCAMPO, 1981). Todavia este farmaco apresenta relevantes efeitos adversos como: desorientação, insônia, anorexia, perda de peso, náuseas e vômitos (CASTRO *et al.*, 2006).

Por outro lado, na terapêutica da Doença de Chagas, o BNZ tem mecanismo de ação que envolve estresse redutivo, incluindo reações covalentes de nitrorredução de radicais intermediários e macromoléculas de componentes celulares como RNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (DE TORANZO *et al.*, 1988; DOCAMPO, 1990), além de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas (STOPPANI, 1999). Os protocolos de tratamento incluem administrações de BNZ na dose de 5mg/Kg/dia por 60 dias, com registros de baixa adesão ao tratamento devido aos efeitos adversos severos e às dificuldades de deglutição do comprimido (VIOTTI *et al.*, 2014).

O BNZ possui solubilidade em água praticamente nula na temperatura ambiente (0,23 mg/mL), sendo mais solúvel em metanol (13,07 mg/mL), acetonitrila (24,74 mg/mL) e acetona (34,54 mg/mL). Em paralelo, apresenta LogP_{ow} menor que 0,7 em fluido gástrico, água destilada ou fluido entérico. Desta forma, está classificado no grupo IV da Classificação Biofarmacêutica (baixa permeabilidade e baixa solubilidade) (MAXIMINIANO *et al.*, 2011).

Estas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do BNZ e os seus efeitos colaterais levam ao resultado terapêutico pouco satisfatório. Os efeitos colaterais mais frequentes associados ao uso de BNZ incluem manifestações de hipersensibilidade, como dermatite; febre; linfadenopatia; dores musculares e articulares; neutropenia; agranulocitose e púrpura trombocitopênica (URBINA 2009; CASTRO *et al.*, 2006).

Assim, devido aos efeitos adversos relacionados à administração destes fármacos, os pacientes tem alto índice de abandono do tratamento, prejudicando assim a evolução do tratamento da doença (COURA *et al.* 1997).

2.2. Tratamento medicamentoso inovador: combinações de ITZ e BNZ

Em pesquisa recente foi observado que inibidores da síntese de ergosterol são candidatos promissores no tratamento da Doença de Chagas (URBINA, 2009a). O ergosterol é uma substância fundamental para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do *T. cruzi*, além de ser importante para sua proliferação *in vitro*. Por essa razão, esta via metabólica se tornou um alvo potencial para a pesquisa de quimioterápicos (URBINA, 1999).

Os compostos mais importantes desse grupo são os derivados azólicos, incluindo os imidazóis e os triazóis. O mecanismo de ação dessas substâncias envolve a inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase dependente do citocromo P450, que causa o acúmulo de 14 α -metilesterol e a diminuição da produção de ergosterol (WHITE *et al.*, 1998).

Esses compostos, por agirem exclusivamente na via de síntese do ergosterol no *T. cruzi*, não afetam a síntese de outros esteróis, como o colesterol em mamíferos, induzindo menores danos às células hospedeiras e menores reações adversas provocadas durante o tratamento.

Alguns estudos têm mostrado que inibidores da biossíntese de ergosterol comercialmente disponíveis para o tratamento de doenças fúngicas, como o cetoconazol, itraconazol ou terbinafina, apresentam atividade anti-*T. cruzi* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* e tratados na fase aguda com itraconazol, os níveis de cura variaram a até 100%. Destes derivados imidazólicos, o Itraconazol apresenta vantagens na escolha para ser utilizado na terapia combinada com Benznidazol por conta de sua disponibilidade no mercado, já que não está protegido por patente, além de ter suas características físico-químicas descritas na literatura científica (HEYKANTS, *et al.*; 1989). Sendo que algumas pesquisas descreveram taxas de cura em 53% e 61% dos pacientes tratados com itraconazol, na fase crônica da infecção, em áreas endêmicas do Chile (APT *et al.*, 1998; ZULANTAY *et al.*, 1998)

Com efeito, terapias combinadas de benznidazol com esses fármacos têm apresentado resultados animadores. Associação deste fármaco com itraconazol demonstrou que culturas de espécies especiais de *T. cruzi* (tipo II) foram mais susceptíveis ao tratamento que as demais (TOLEDO *et al.*, 2003). De forma semelhante estudos comparando os efeitos terapêuticos de BNZ com o fármaco posaconazol apresentaram efeito supressivo sobre parasitas e levou a detecção de nenhum traço de DNA de *T. cruzi* em pacientes na fase crônica da doença (MOLINA *et al.*, 2014).

A terapia combinada de Benznidazol e outros derivados azólicos levou a resultados que apresentam um cenário onde a utilização de mais de um fármaco no tratamento da Doença de Chagas, pode levar a diminuição dos efeitos adversos e notável redução da carga parasitária (FONSECA-BERZAL *et al.*, 2014).

Todavia, o itraconazol (ITZ) pertence a uma classe de antifúngicos triazólicos caracterizados pela sua alta lipofilicidade, boa absorção oral e extensa distribuição nos tecidos. Suas propriedades físico-químicas incluem pKa igual a 3,7 (apresenta-se ionizado no suco gástrico), coeficiente de partição de 5,7 em pH 8,1 (alta lipofilicidade) e solubilidade aquosa bastante reduzida, inferior a 5µg/mL em soluções ácidas diluídas em temperatura ambiente (HEYKANTS *et al.*, 1989; LUEHRING, 2012). Assim, por se apresentar como um fármaco desafiador na formulação de formas farmacêuticas, o ITZ deve passar por aprimoramentos farmacotécnicos para aumentar a sua dissolução e absorção.

2.3. Estudos de pré-formulação

Uma vez que a terapia combinada de Benznidazol e Itraconazol se mostra com importante potencial para ser utilizadas nas terapêuticas para tratamento da Doença de Chagas, estudos de pré-formulação são essenciais para desvendar a compatibilidades entre os componentes das formulações.

Nos estudos de pré-formulação são verificadas as ocorrências de interações entre fármacos e excipientes. Estas avaliações se tornam um exercício imprescindível para a correta seleção de excipientes e aumentam a possibilidade do desenvolvimento de uma formulação de sucesso. Em particular, os estudos de pré-formulação tem-se tornado ainda mais desejáveis do ponto de vista comercial, devido a busca da redução de custos operacionais por meio da

predição de interações fármaco-excipientes durante a fase inicial de desenvolvimento de uma formulação (KUMAR *et al.*, 2013). As incompatibilidades entre componentes de uma formulação podem alterar as características físico-químicas dos princípios ativos e excipientes, e desta forma, podem afetar a eficácia e a sua segurança do medicamento (VERMA *et al.*, 2005).

Os estudos de compatibilidade envolvem o uso de misturas físicas de fármacos com um ou mais excipientes onde as proporções das misturas são geralmente mantidas em quantidades equivalentes (1:1, m/m) para aumentar o contato entre os componentes e de mesma forma a propabilidade de ocorrência de interações. Também são essenciais as avaliações sobre o impacto gerado pela alteração da temperatura e o envolvimento com água, simulando operações que ocorrem nas rotinas de fabricação, e partindo do princípio que a umectação e o aquecimento podem aumentar as interações moleculares, induzindo a degradações mais rápidas (CHADA, 2014).

Dentre os métodos utilizados nos ensaios de pré-formulação destacam-se as avaliações da pureza dos componentes medidas por aparelhos de cromatografia, difração de raios-x, cristalografia, as avaliações sobre as características organolépticas, solubilidade, espectroscopia, propriedades de fluxo e microscopia dentre outras (AULTON, 2005).

No mesmo sentido, os ensaios de calorimetria diferencial de varredura (DSC) têm sido usados frequentemente nos estudos de compatibilidade fármaco-excipientes devido a sua sensível e rápida resposta (KUMAR *et al.*, 2013; MAXIMIANO, 2011). Paralelamente, ensaios complementares como a espectroscopia de infravermelho e a microscopia óptica auxiliam na interpretação dos resultados e têm sido utilizados recentemente (SATYAVATHI *et al.*, 2014). Dados de espectroscopia de infravermelho podem apresentar mudanças nas bandas características das substâncias, nos comprimentos de ondas característicos de certas moléculas e assim evidenciar alterações moleculares causadas pelas misturas e/ou tratamentos das amostras. Por outro lado, a microscopia das substâncias simples e misturas, pode demonstrar alterações físicas e de macroestrutura que, também, podem evidenciar incompatibilidade entre os componentes de uma formulação.

De forma geral são montados protocolos onde análises são realizadas com as substâncias simples dos princípios ativos e excipientes selecionados, e posteriormente comparadas com resultados de análises sobre amostras tratadas. Dentre estas amostras tratadas pode-se destacar o uso de misturas equimassa que podem ser umedecidas, submetidas

a stress luminoso, aquecimento ou qualquer outra técnica que se simule as condições de fabricação que este produto pode passar durante um processo produtivo (SATYAVATHI *et al.*, 2014).

2.4. Melhoramento das formas farmacêuticas: microprecipitações e sistemas multiparticulados.

Uma vez que o Itraconazol e o Benznidazol são fármacos de baixa solubilidade em água em temperatura ambiente (5µg/mL e 0,23 mg/mL, respectivamente), são necessárias medidas tecnológicas adicionais para se buscar um medicamento com absorção e distribuição mais rápida e extensa. O melhoramento destas características pode levar a incorporação de quantidade menor do fármaco em um forma farmacêutica e conseqüentemente reduzir os efeitos adversos e teoricamente melhorar a resposta ao tratamento da Doença de Chagas.

Técnicas como recristalização, moagem e micronização têm sido utilizadas para aumentar a dissolução de fármacos (RASENACK & MULLER, 2002). De forma similar, a técnica de microcristalização, ou microprecipitação, que envolve troca de solventes polares e apolares e utilização de polímeros para aumentar a solubilidade do Itraconazol e apresentou bons resultados (MILLER, *et al.*, 2010). Por esta razão, a inclusão de técnicas de microprecipitação para melhoria das características deste fármaco podem ser utilizadas no desenvolvimento de nova forma farmacêutica a ser utilizada no presente estudo.

Adicionalmente, deve-se acrescentar na discussão que o desenvolvimento de uma forma farmacêutica oral tem início na seleção do tipo de forma farmacêutica e da tecnologia de modulação da liberação do fármaco que serão empregados. Em relação ao tipo de forma farmacêutica, esta pode se constituir em sistemas monolíticos ou multiparticulados. Nos sistemas monolíticos, a unidade funcional de liberação é única (comprimido ou cápsula) e a dose não está dividida. Já as formas farmacêuticas multiparticuladas contêm o fármaco dividido em várias subunidades funcionais de liberação, que podem ser grânulo ou péletes (aglomerados de partículas sólidas com formato esférico) ou minicomprimidos (comprimidos com diâmetro inferior a 3 mm). Essas subunidades, por sua vez, são veiculadas em cápsulas gelatinosas duras ou em comprimidos que desintegram rapidamente após a administração, liberando as mesmas no trato gastrointestinal (PEZZINI, *et al.*, 2007).

Desta forma o desenvolvimento de uma formulação em péletes (**Figura 4**) traz a vantagem de poder modular uma liberação mais rápida e intensa dos fármacos. Sendo, neste caso, apontada como uma propriedade de grande valor, pela natureza e propriedade físico-químicas dos fármacos estudados.

Outras vantagens que os péletes encapsulados em cápsulas sólidas ou moles oferecem outras quando comparados com comprimidos ou outras formas sólidas de dose unitária podem ser numeradas como fisiológicas ou tecnológicas. Dentre as vantagens fisiológicas estão a irritação gástrica reduzida e a transição gastrointestinal prolongada, que são atribuídas à maior distribuição dos péletes no trato gastrointestinal. Já as vantagens tecnológicas (formulação fixa ou combinada com diferentes fármacos, esfericidade, melhor fluxo, possibilidade de revestimento facilitado, superfícies mais lisas e regulares, distribuição uniforme de tamanhos de partículas e baixa friabilidade) asseguram a uniformidade de conteúdo, pois podem garantir uma boa propriedade de fluxo e sucesso de revestimento. Da mesma forma, os péletes oferecem grande flexibilidade de dosagem e liberação do fármaco com a incorporação de polímeros matriciais ou de revestimento com distintas solubilidades aquosas; tratamentos pós elaboração ou diferentes métodos de secagem que possibilitam modificações da microestrutura, porosidade e tortuosidade dos poros (DUKIC-OT *et al.*, 2007).

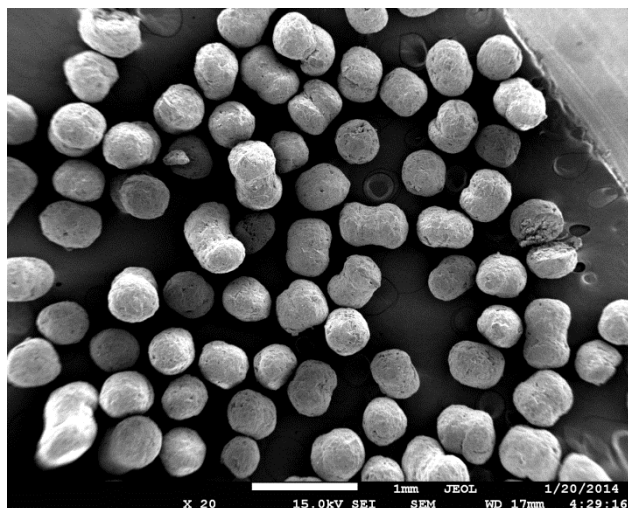


Figura 4: Fotomicrografia de péletes de ITZ tomadas em microscópio eletrônico de varredura. (20X)

De modo geral, o processo de produção de péletes, denominado peletização, consiste na aglomeração de pós de substância ativa e excipientes em pequenas unidades esféricas. Para isto, algumas técnicas para a produção de péletes são descritas em literatura, dentre elas pode-se citar a peletização por revestimento. Esta técnica consiste na aplicação de sucessivas

camadas de solução, suspensão ou pós-secos contendo princípio ativo, ou excipiente, sobre um núcleo que contem cristais ou grânulos do mesmo material ou um material inerte (DEVICES GSI, 1989).

Outra forma de peletização é a denominada técnica de criopeletização. Nesta técnica os péletes são formados quando gotas de um líquido de formulação, geralmente na forma de solução, suspensão ou emulsão, entram em contato com nitrogênio líquido mantido na temperatura de -160°C . Este nitrogênio líquido, utilizado como meio de solidificação, permite congelamento e solidificação instantânea do material a ser processado devido à rápida transferência de calor. Todavia esta técnica é de alto custo, pois depende da instalação de locais específicos para armazenamento deste gás e de controles especiais sobre o processo (CHEBOYINA, 2004).

Há ainda, a técnica de peletização por fusão ou congelamento que é uma técnica simples e que traz vantagens significativas por conta da avaliação do custo-benefício. Da mesma forma que o baixo custo de manutenção processo é relevante, os processos de secagem são desnecessários e a qualidade do péletes obtido é superior a outras técnicas de peletização. Nesta técnica, um veículo sólido é fundido e disperso juntamente com um ingrediente ativo e depois introduzido na forma de gotículas em uma coluna com um determinado líquido composto de material inerte e imiscível (CHEBOYINA, 2008).

Por fim, outros dois métodos de peletização são comumente utilizados: a extrusão a quente e a extrusão-esferonização. Na extrusão a quente, o processo ocorre por três etapas básicas: a fusão, a modelagem do material e a solidificação. Esta técnica apresenta a vantagem de não utilizar água ou outro solvente no processo, eliminando assim a etapa de secagem e garantindo a uniformidade da dispersão em partículas bem finas. Além de não requerer características de compressibilidade dos ingredientes ativos e ser bastante estável em misturas com pH variáveis (CHOKSHI, 2004).

No processo de produção de péletes, a técnica de extrusão-esferonização está em destaque por sua reprodutibilidade, alta tecnologia, facilidade de operação, menor custo com mão de obra, redução dos pontos críticos de processo a serem controlados, além da recorrência de menores quantidade de problemas com desvios de qualidade. Esta técnica é baseada em quatro operações unitárias: malaxagem, extrusão, esferonização e secagem (**Figura 5**).



Figura 5: Equipamentos de pelletização por extrusão esferonização. Extrusor de rolos (à esquerda), Esferonizador (ao centro) e Secadora/Estufa (à direita).

Na malaxagem, há uma mistura homogênea de pós seguida pela umectação com líquido apropriado. A obtenção de uma massa devidamente umedecida é fundamental na formação das massas extrusadas que permite a melhor esferonização, sem formação de pós ou aglomerados de partículas (SANTOS, 2004; SARKHAR, 2014). A escolha do líquido de umectação e a quantidade utilizada parecem influenciar diretamente na dureza e esfericidade dos péletes, como também a formação de microfuros e aglomerados. Os pontos críticos a serem controlados na etapa de malaxagem são o tipo e a quantidade de líquido de umectação, velocidade e tempo de malaxagem e a forma de adição do líquido de umectação (golpe ou aspersão) (MILLILI, 1990).

Na extrusão, a massa umedecida sofre compactação, sendo modelada em bastões cilíndricos de diâmetro uniforme. Dentre os aparelhos e técnicas para extrusão (parafuso infinito, cestos e tamise pistão) o extrusor de rolos esteve disponível para a realização do presente estudo. Nele, a rotação segue em mesmo sentido e uma placa com orifícios de tamanho padronizados força a passagem da massa para fora no aparelho. Nesta etapa, deve-se padronizar e controlar a velocidade e o tempo de extrusão, além da abertura da malha utilizada (SANTOS, 2004). Na esferonização, os bastões cilíndricos são dispostos em aparelho giratório com superfície abrasiva. O tempo, a velocidade de rotação e as características do prato de fricção são os principais ajustes feitos e influenciam diretamente no tamanho e forma do pélete produzido (PODCZECK, 2014). Por fim, a secagem dos péletes pode ocorrer em leito fluidizado (SCHRANK, 2013) ou em estufa (GOYANES, 2011), ambos

com resultados satisfatórios quando assegurados os tempos e temperaturas ideais padronizadas.

Os péletes oferecem ainda a possibilidade de promover uma rápida liberação com uma mistura efervescente do fármaco em sistemas de liberação acelerada pela adição em sua matriz de desagregantes, tensoativos ou polímeros hidrofílicos (DUCKIC-OT, 2007; HAMEDELNIEL, 2010). Esta possibilidade, somada a sua excelente flexibilidade de dosagens e possibilidade de associações, fazem com que essa forma farmacêutica se adeque de forma única a uma terapia dose fixa combinada.

Além disso pode-se destacar que: a) As características de fluxo dos péletes fazem com que o transporte seja mais adequado aos sistemas de transferência de material na indústria, incluindo transferência com bomba de vácuo. b) A inserção de pequenos péletes dentro de pequenos recipientes, como por exemplo, cápsula gelatinosa é mais conveniente do que outras formas como grânulos ou pós. O que elimina problemas com variações de quantidade envasada por conta de ajustes incertos nos maquinários de fabricação. c) Os péletes são um material denso e provê menor área de superfície para o mesmo volume e então os componentes farmacêuticos podem ser revestidos com uma quantidade menor de material de revestimento. Fato importante para uma liberação mais eficaz de alguns fármacos. d) O revestimento dos péletes pode promover uma liberação controlada do fármaco, alvejando locais diferentes para liberação no trato gastrointestinal. Fato importante para a eficácia de alguns fármacos. e) Partículas esféricas são mais facilmente misturadas. Além de serem mais polidas e assim, melhores para a aplicação e solução de revestimento, minimizando a quantidade e o tempo necessário nesta operação unitária. f) Partículas esféricas têm reduzidos índices de friabilidade e maior dureza, reduzindo a perda durante transporte, processamento ou embalagem (KANDUKURI, 2009).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

A proposta do presente trabalho constitui-se no desenvolvimento de sistemas multiparticulados para o tratamento da Doença de Chagas em terapia dose fixa combinada. Todavia para o alcance deste objetivo algumas etapas intermediárias devem ser concluídas, dentre elas, estudos de pré-formulação e estudos de formulação.

3.1. Objetivos específicos

Para tanto, foi necessário seguir os seguintes objetivos:

- Realizar estudos de compatibilidade fármaco-fármaco entre os princípios ativos BNZ e ITZ.
- Realizar estudos de compatibilidade entre o fármaco BNZ e ITZ com os excipientes β CD, CMC, HP β CD, MgSt, NaCrosc, NaGlico, PEG, PVP e RM β CD.
- Elaboração de microprecipitados de BNZ e ITZ.
- Elaboração de péletes de BNZ e ITZ por meio da extrusão-esferonização, utilizando os excipientes compatíveis previamente definidos.
- Caracterização físico-química das formulações elaboradas.

4. CAPÍTULO 1

4. CAPÍTULO 1

4.1. Estudos de preformulação de Itraconazol associado com Benznidazol e excipientes farmacêuticos.

4.1.1. Introdução

A morbidade e a mortalidade associadas à Doença de Chagas são alguns dos mais eminentes problemas de saúde encontrados em países em desenvolvimento e afeta cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014). A Doença de chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é tratada com Benznidazol (BNZ), um fármaco de Classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) que causa fortes efeitos adversos nos pacientes (MAXIMIANO, 2010).

Estudos recentes demonstraram importante efeito sinérgico quando benznidazol é associado a outros fármacos (FAUNDEZ, 2005; CORONADO, 2006; STRAUSS, 2013). Antifúngicos azólicos tais como o itraconazol (ITZ) tem demonstrado eficácia contra a Doença de Chagas; todavia, devido a sua baixa solubilidade em água na temperatura ambiente (1µg/mL) e biodisponibilidade (55%), altas doses são requeridas para formulação de formas farmacêuticas sólidas (APT, 2003; MAXIMIANO, 2011).

Neste contexto, a terapia antichagásica pode ser melhorada por novas formulações contendo BNZ e ITZ, juntamente com inovações tecnológicas tais como complexos de inclusão com ciclodextrinas para reverter problemas com solubilidade (MAXIMIANO, 2011). Assim, estudos de preformulação são essenciais para o apropriado desenvolvimento de formas farmacêuticas.

Análises termogravimétricas são frequentemente utilizadas nos estudos de pré-formulação por causa de suas habilidades em prover dados rápidos e precisos sobre as características físicas e propriedades energéticas das substâncias. Incluem-se avaliações sobre a temperatura de fusão, degradações, decomposições, cristalização, transições de temperatura e transição vítrea. Recentemente, os usos de análises térmicas se tornaram o método de escolha para avaliar a compatibilidade entre fármacos e excipientes por que pode ser facilmente incrementada nas rotinas laboratoriais (LIRA, *et al.* 2007; SINGH, *et al.*, 2012).

Então, o objetivo desta pesquisa é estudar a compatibilidade entre ITZ com BNZ e excipientes farmacêuticos selecionados. Desta forma, técnicas térmicas como análises de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas com suporte por análises espectroscópicas de infravermelho transformada de Fourier e microscopia óptica. Adicionalmente, análises das cinéticas de reação foram realizadas em condições isotérmicas.

4.1.2. Materiais

O fármaco Itraconazol (ITZ, lote 00569488) foi gentilmente doado pela empresa Janssen-Cilag Pharmaceutica (Geel, Bélgica). O fármaco Benznidazole (BNZ, lote 13871) foi obtido da empresa Roche (Basileia, Suíça). Todos os excipientes utilizados são de grau farmacêutico: β -ciclodextrina (β CD), hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), hidroxipropil metilcelulose (HPMC, lote 006032, São Paulo, Brasil), Estearato de magnésio 1651 (StMg, lote GD3X15, Casa das Essências, São Paulo, Brasil), Polivinilpirrolidona K-30 (PVP, lote 20040122, Genix Farmacêutica, Anápolis, Brasil) e β -ciclodextrina metilada randomizada (RM β CD). Adicionalmente foram utilizados amostras Croscarmelose sódica (NaCrosc, lote 2060890, Genix Farmaceutica, Anápolis, Brasil), Polietilenoglicol 6000 (PEG, lote 200682A, Casa da Química, São Paulo, Brasil), Celulose microcristalina PH 101 (CMC, lote, C1007046, Via Farma, São Paulo, Brasil) e Glicolato amido de sódio (NaGlico, lote XB2034, Casa da Química, São Paulo, Brasil).

4.1.3. Métodos

Preparação das amostras

As misturas físicas (MF ou PM) foram preparadas com misturas binárias equimassa (1:1 m/m) de ITZ, BNZ e excipientes selecionados. As misturas umedecidas (MU ou WM) foram preparadas pela adição de algumas gotas de água purificada sobre as PM para se obter uma massa umedecida. Um misturador automático foi utilizado para homogeneizar as misturas umedecidas e as amostras foram secadas em estufa a 30°C por 6 horas.

As amostras fotosensibilizadas (AF ou PS) foram obtidas pela submissão de material a estresse luminoso em câmara de fotoestabilidade (CARON[®]UV/Vis), seguindo o Guia ICH Q1B. Adicionalmente, misturas binárias foram aquecidas até 160°C em equipamento calorímetro DSC-60A para avaliações posteriores. Este tratamento provê condições não

destrutivas a cada material isolado, os quais mantêm suas propriedades físicas e químicas. Estas misturas foram então denominadas amostras aquecidas (AF ou HM).

Calorimetria Diferencial de Varredura

Esta análise foi realizada em equipamento calorímetro DSC-60A (Shimadzu, Japão) (**Figura 6**) utilizando as amostras de aproximadamente 4,0 mg em cadinho de alumínio selados e mantidos sob atmosfera dinâmica de gás nitrogênio, com rampas de aquecimento de 10°C/min, no intervalo de temperatura de 30°C a 250°C. O aparelho de DSC foi calibrado utilizando os elementos químicos Índio e Zinco, tal como descrito no seu manual de operação.



Figura 6: Calorímetro DSC-60A (Shimadzu, Japão).

Termogravimetria Derivativa

Os intervalos de decomposição e as variações de perdas de peso das amostras foram avaliadas utilizando uma termobalança Shimadzu DTG-60 (Shimadzu, Japão) (**Figura 7**), sob fluxo de nitrogênio de 50 mL/min na rampa de aquecimento de 10°C/min, partindo de 30°C a 400°C. Os testes foram realizados individualmente, com amostras de aproximadamente 5,0 mg colocados em cadinhos de platina.



Figura 7: Termobalança DTG-60 (Shimadzu, Japão).

Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier

Os espectros foram registrados num espectrômetro Varian 640-IR FTIR (Varian Inc, Brasil) (**Figura 8**) entre 4500 cm^{-1} e 600 cm^{-1} com uma resolução óptica de 4 cm^{-1} com acessório Imaging ATR acoplado. Todas as edições dos espectros foram realizadas utilizando o software Resolution PRO Suite.

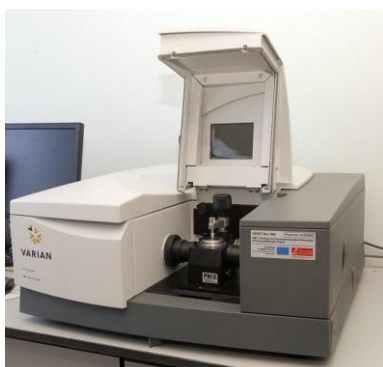


Figura 8: Espectrometro FT-IR. (Varian 640-IR FTIR).

Microscopia Óptica

As características morfológicas das amostras foram analisadas utilizando um microscópio Olympus SZ60 (Opelco, Japão) conectado a uma câmera de vídeo Olympus DP12 (Opelco, Japão). O processamento das imagens foi realizado utilizando o software Analysis, versão 3.2.

Estudos de Termogravimetria Isotérmica

Investigações cinéticas da degradação dos fármacos foram realizadas utilizando experimentos de termogravimetria isotérmica. Amostras foram colocadas em cadinhos de platina e aquecidos em rampa de 20°C/min em termobalança DTG-60 sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min) até alcançar uma temperatura próxima da temperatura de decomposição do fármaco. Uma vez que a temperatura foi alcançada, esta temperatura é mantida constante por um período de tempo necessário para reduzir 5% do peso inicial da amostra. Os intervalos de temperatura isotérmicos para o ITZ foram entre 290-330°C, enquanto o intervalo de temperatura para BNZ foi entre 190-230°C. Avaliações das amostras físicas de ITZ-BNZ foram também realizadas no intervalo de 190-230°C. Uma equação de Arrhenius foi estabelecida com base nos dados experimentais para determinar as energias de ativação das substâncias simples e misturas físicas.

4.1.3. Resultados e Discussões

Estudos recentes sugerem que associações entre ITZ e BNZ numa mesma forma farmacêutica podem levar a uma terapia antichagásica significativamente melhorada. Então, estudos de compatibilidade entre os componentes e excipientes farmacêuticos tem grande importância na obtenção de formas farmacêuticas sólidas estáveis.

Para revelar possíveis incompatibilidades entre os componentes estudados, as misturas binárias foram sujeitas a diferentes tratamentos (PM, WM, PS e AF) simulando processos farmacotécnicos e processos de envelhecimento.

Os dados de calorimetria diferencial de varredura de ITZ e suas misturas PM, WM e PS estão demonstradas na **Tabela 1**. Os parâmetros térmicos e os graus de interação para cada mistura binária estudada foram analisados.

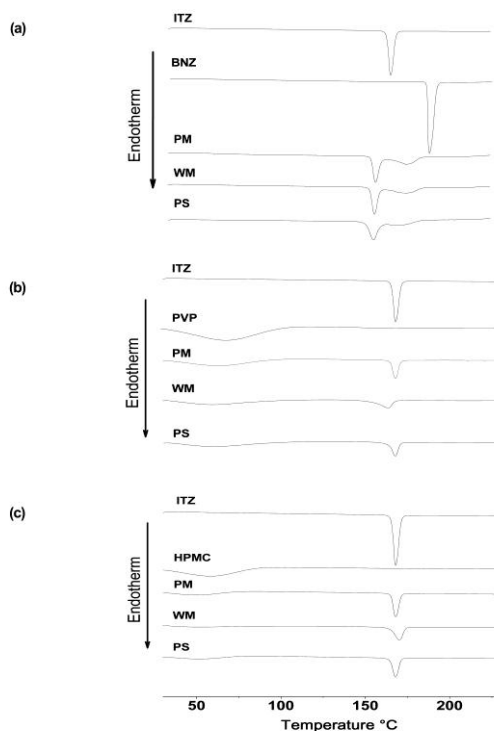
Tabela 1: Dados de calorimetria diferencial de varredura das misturas físicas:

Amostra	T _{peak} (°C)	Entalpia (ΔH) (J g ⁻¹)	Intervalo de fusão (°C)	Interações Térmicas ¹	
ITZ	167,89	85,97	(166-171)	0	
BNZ	190,91	139,30	(189-195)	0	
ITZ + MCC	PM	167,81	40,61	(165-170)	0
	MU	167,52	40,93	(165-171)	0
	AF	167,80	40,55	(165-171)	0
ITZ + βCD	PM	168,12	43,20	(165-171)	0
	MU	167,05	40,40	(163-170)	0
	AF	167,87	42,24	(164-171)	0
ITZ + BNZ	PM	158,82	49,59	(156-162)	+++
	MU	158,40	45,64	(156-161)	+++
	AF	157,42	46,03	(153-171)	+++
ITZ + HPβCD	PM	168,31	42,44	(165-171)	0
	MU	167,31	39,84	(164-171)	0
	AF	167,78	33,06	(164-171)	0
ITZ + HPMC	PM	168,02	42,03	(165-171)	0
	MU	170,13	34,60	(165-174)	+
	AF	167,78	33,48	(164-171)	0
ITZ + MgSt	PM	167,58	40,27	(165-170)	0
	MU	167,45	42,88	(165-170)	0
	AF	167,49	45,04	(166-170)	0
ITZ + PVP	PM	167,97	40,08	(165-171)	0
	MU	163,54	37,82	(153-167)	++
	AF	167,26	39,20	(164-170)	0
ITZ + RMβCD	PM	168,04	42,06	(165-171)	0
	MU	166,90	40,15	(164-170)	0
	AF	167,82	45,70	(164-171)	0

¹ (0): nenhuma; (+): fraca; (++) : forte; (+++): muito forte

As curvas dos gráficos de calorimetria diferencial de varredura do ITZ (**Gráfico 1**) demonstraram um único sinal endotérmico a 167,9°C, correspondente ao ponto de fusão desta substância que ocorre no intervalo de 166-171°C. Este comportamento confirma a estrutura cristalina do fármaco e está de acordo com estudos anteriores. Adicionalmente, os resultados de termogravimetria derivativa demonstraram que o ITZ permanece estável até 330°C, quando sua decomposição se inicia, culminando na perda de massa de 61,22% do peso da amostra durante o primeiro estágio da sua decomposição. O pico endotérmico relatado à temperatura de fusão do BNZ está bem definido na temperatura de 190,9°C, e este fenômeno ocorre entre 189°C e 195°C, intervalo este completamente diferente do intervalo de ITZ.

Gráfico 1: Curvas calorimétricas obtidas de DSC para substâncias simples, amostra umedecida e amostra fotosensibilizadas. a) ITZ + BNZ; b) ITZ + PVP; c) ITZ + HPMC:



As combinações de ambos os fármacos promoveram fortes mudanças nos picos de fusão dos produtos, com uma alteração de aproximadamente 10°C. Suas misturas físicas apresentaram temperaturas de fusão de 158,8°C e 177,7°C para ITZ e BNZ, respectivamente. Ocorreram interações térmicas intensificadas nas misturas umedecidas e fotosensibilizadas ocasionando num decaimento das temperaturas de fusão. As amostras fotosensibilizadas apresentaram um alargamento do pico de fusão do ITZ e quase desaparecimento do pico de fusão de BNZ.

As misturas de ITZ com PVP demonstraram nenhuma interação nas amostras de PM e PS. Todavia, o pré-tratamento das misturas com água (MU ou WM) causaram uma mudança marcante nos parâmetros térmicos de ITZ, incluindo o pico de fusão e sua entalpia relacionada. Similarmente, as amostras de ITZ-HPMC mostraram interações térmicas de média intensidade nas misturas umedecidas, exibindo um pico de fusão alargado e alterado para maiores temperaturas, junto com uma queda na entalpia. O estresse luminoso favoreceu a redução da entalpia das amostras fotosensibilizadas.

A escolha das ciclodextrinas neste estudo foi baseada nas suas habilidades de melhorar os perfis de dissolução de ITZ e BNZ como descrito na literatura (MAXIMIANO, 2011; ALSARRA, 2010). De acordo com os resultados de DSC, as ciclodextrinas selecionadas (β CD, HP β CD e RM β CD) exibiram pequenas interações térmicas, em especial nas misturas umedecidas. A literatura estabeleceu que estas mudanças térmicas ocorrem como o resultado da formação de complexos de inclusão *in situ*, levando a pequenas alterações nas curvas de DSC. O processo de umedecimento também fomenta a formação de complexos de inclusão. Este fenômeno leva ao efeito desejável, mas não compromete a estabilidade da formulação (MAXIMIANO, 2010; MARINESCU, 2013).

Os outros excipientes estudados, estearato de magnésio e celulose microcristalina, não apresentaram qualquer sinal de interação térmica. Assim sendo, são considerados compatíveis e elegíveis em formulações com ITZ.

Dos dados de termogravimetria derivativa (DTG) (**Tabela 2**) informam a temperatura do início da decomposição das amostras e a perda de peso envolvida com esse evento. Variações na temperatura inicial de decomposição das misturas podem ser explicadas pela complexidade do evento de decomposição, o qual pode envolver várias reações químicas simultâneas.

No entanto, a mistura de ITZ-BNZ mostrou uma grande mudança na temperatura de início da degradação da amostra (de 330°C para 239°C), que foi provavelmente mais influenciado pelo BNZ, cuja decomposição ocorre a aproximadamente 300°C. As perdas de peso envolvidas na decomposição também variaram muito e foram influenciadas pela presença dos excipientes. Uma vez mais, grandes alterações foram observadas na mistura binária de fármacos. Os dados DTG em conjunto sugerem problemas de estabilidade nesta associação.

Tabela 2: Dados de termogravimetria (DTG) de ITZ nos testes de compatibilidade fármaco-excipientes:

Amostra		Decomposição (°C)	Perda de peso (%)
ITZ		330.3	60.8
ITZ + CMC	MF	301.7	76.6
	MU	306.6	75.0
ITZ + β CD	MF	306.7	69.7
	MU	310.5	72.0
ITZ + BNZ	MF	238.9	28.3
	MU	239.2	28.4
ITZ + StMg	MF	299.8	75.1
	MU	301.0	55.2
ITZ + HP β CD	MF	312.8	70.2
	MU	310.2	78.4
ITZ + HPMC	MF	322.6	66.9
	MU	314.8	61.8
ITZ + PVP	MF	357.1	43.1
	MU	356.2	43.8
ITZ + RM β CD	MF	330.1	65.8
	MU	335.8	62.8

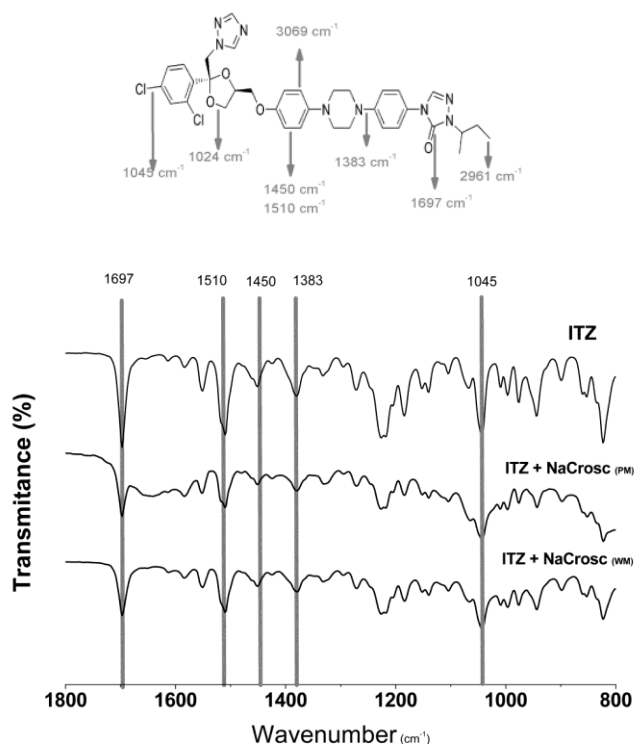
A **Tabela 3** apresenta os dados térmicos de ITZ puro e em mistura binária com NaCrosco. Percebe-se que os picos de fusão do ITZ foram levemente alterados na mistura física recém-preparada (PM), inclusive com alargamento do intervalo de fusão de 166-171 para 160-169 °C. Esse alargamento do pico também é observado nas mistura umedecidas (MU ou WM). Adicionalmente, nota-se uma redução da entalpia de fusão do fármaco nas misturas físicas recém-preparadas e umedecidas, tornando evidente possibilidade de interação térmica entre estes dois componentes.

Tabela 3. Dados de DSC de ITZ e ITZ + NaCrosco.:

Amostras		T _{peak} (°C)	Intervalo (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
ITZ	puro	167,89	166-171	85,97
ITZ + NaCrosco	PM	165,03	160-169	30,58
	WM	167,65	162-167	33,51

Para verificar a repercussão que a interação de ITZ com NaCrosol pode ter na estabilidade química do fármaco, testes adicionais de FTIR foram realizados. O **Gráfico 2** mostra os espectros das misturas binárias de ITZ e NaCrosol em mistura física (PM) e mistura umedecida (WM). As bandas marcadas são correspondentes aos grupos funcionais da molécula de ITZ e não apresentaram nenhuma alteração de posição. Não há, portanto, nenhum sinal de degradação do fármaco, assumindo-se dessa forma que esses componentes são compatíveis quimicamente. Dessa forma a NaCrosol foi inserida na formulação de péletes de ITZ.

Gráfico 2. Espectros de FTIR de ITZ e suas misturas física (PM) e umedecida (WM) com NaCrosol. As bandas marcadas correspondem aos grupos funcionais de ITZ.



Os dados de DSC das avaliações sobre a compatibilidade de BNZ com excipientes estão apresentados na **Tabela 4**. Nenhuma interação foi observada nas misturas físicas com exceção da amostra BNZ-PEG, que teve um pico de fusão a 178,99°C, em lugar da temperatura de fusão de BNZ a 190,9°C. Da mesma forma, as misturas umedecidas (WM) mostraram mudanças significativas no ponto de fusão de todas as misturas binárias do fármaco. Além disso, foram observadas reduções na entalpia de misturas binárias contendo NaCrosol e PEG, confirmando a interação térmica entre esses compostos e BNZ.

Tabela 4. Dados de DSC de BNZ e suas misturas com excipientes CMC, NaCrocsc, NaGlico e PEG:

Amostra		T _{peak} (°C)	Intervalo (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
BNZ	puro	190,91	189-195	139,30
BNZ + CMC	PM	190,23	185-195	66,14
	WM	192,82	187-197	55,88
BNZ + NaCrocsc	PM	190,38	186-195	62,92
	WM	195,65	188-199	36,09
BNZ + NaGlico	PM	189,61	186-195	55,43
	WM	184,49	184-199	76,95
BNZ + PEG	PM	178,99	167-187	24,81
	WM	179,21	166-185	40,93

A segunda parte deste estudo consistiu em uma análise mais aprofundada das misturas binárias que mostraram interações nos estudos térmicos preliminares. Portanto, as misturas de ITZ com BNZ, PVP e HPMC foram submetidas a um aquecimento a temperaturas próximas da temperatura de fusão da zona de transição (MA). Este tratamento térmico por si só não é suficiente para induzir a decomposição dos compostos estudados; no entanto, aumenta a interação entre os componentes e poderia intensificar qualquer evidência de incompatibilidades físicas e químicas. Nesta etapa, as amostras aquecidas foram analisadas por microscopia óptica e FTIR.

As fotomicrografias das amostras HM mostraram alterações marcantes na morfologia quando comparados com as amostras de PM (**Figura 9**). As fotomicrografias de ITZ-BNZ mostraram aglomerado coeso amarelo escuro nas amostras HM e pó amorfo branco, fino nas amostras MP. Da mesma forma, a amostra HM de ITZ-HPMC revelou uma massa coesa amarela clara com pequenos pontos pretos. As amostras HM de ITZ-PVP mostraram uma massa pastosa esférica, contrastando completamente com o pó branco bem disperso nas amostras MP.

Esses resultados apresentam evidentes mudanças físicas nas misturas envelhecidas. Os espectros de FTIR dos componentes individuais e as misturas binárias, antes e depois de aquecimento são mostrados no **Gráfico 3**. A mistura aquecida de ITZ-BNZ apresentou claros sinais de decomposição, com mudanças importantes as bandas de absorção ITZ. Foram

observadas fortes reduções na intensidade de bandas a 1697 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} e $1,450\text{ cm}^{-1}$, o que correspondem ao grupo carbonila e a deformação axial do esqueleto aromático. Um deslocamento da banda correspondente à ligação C-N (a partir de $1,383\text{ cm}^{-1}$ para $1,361\text{ cm}^{-1}$) e o desaparecimento da banda correspondente à ligação C-Cl a 1045 cm^{-1} were também observado. Alterações importantes podem ser observadas no espectro de FTIR para a HM de ITZ com HPMC e PVP. A forte diminuição da intensidade e um alargamento das bandas nas frequências de 1.697 cm^{-1} e 1045 cm^{-1} denotado uma forte interação entre os componentes, o que indica algum grau de degradação química. A zona de transição de HPMC-HM também mostrou alterações na intensidade das bandas correspondentes à ligação C-N e a deformação axial do anel aromático.

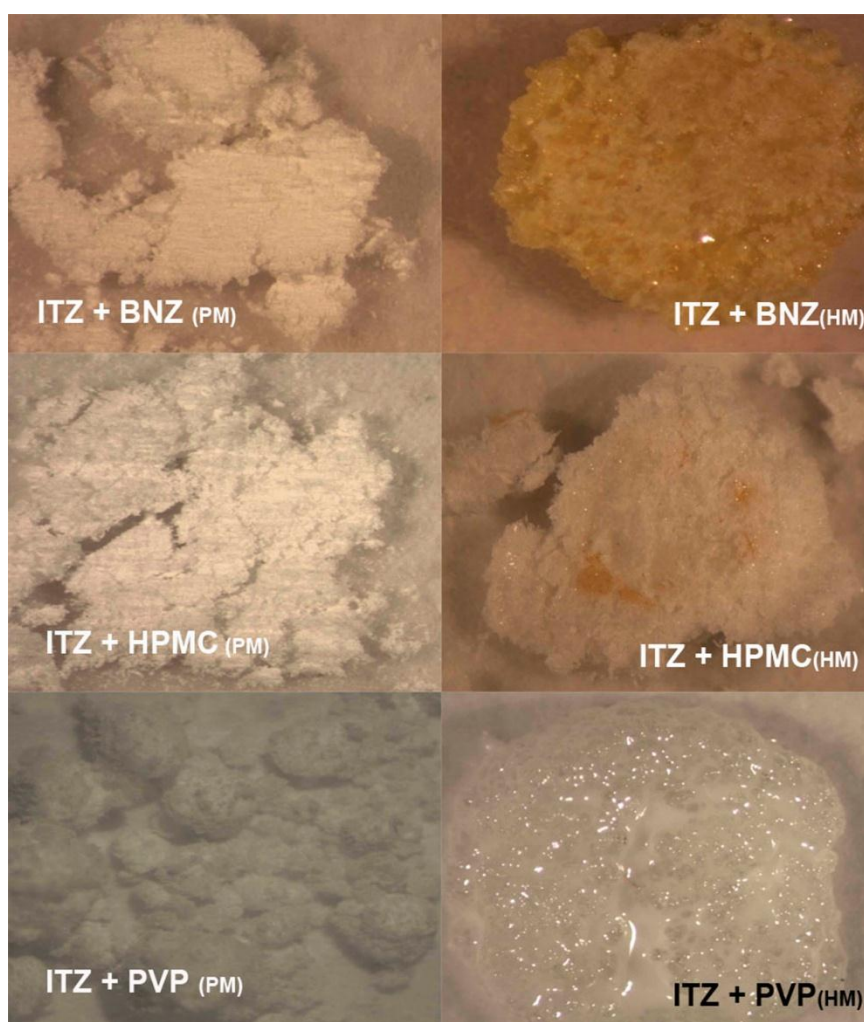
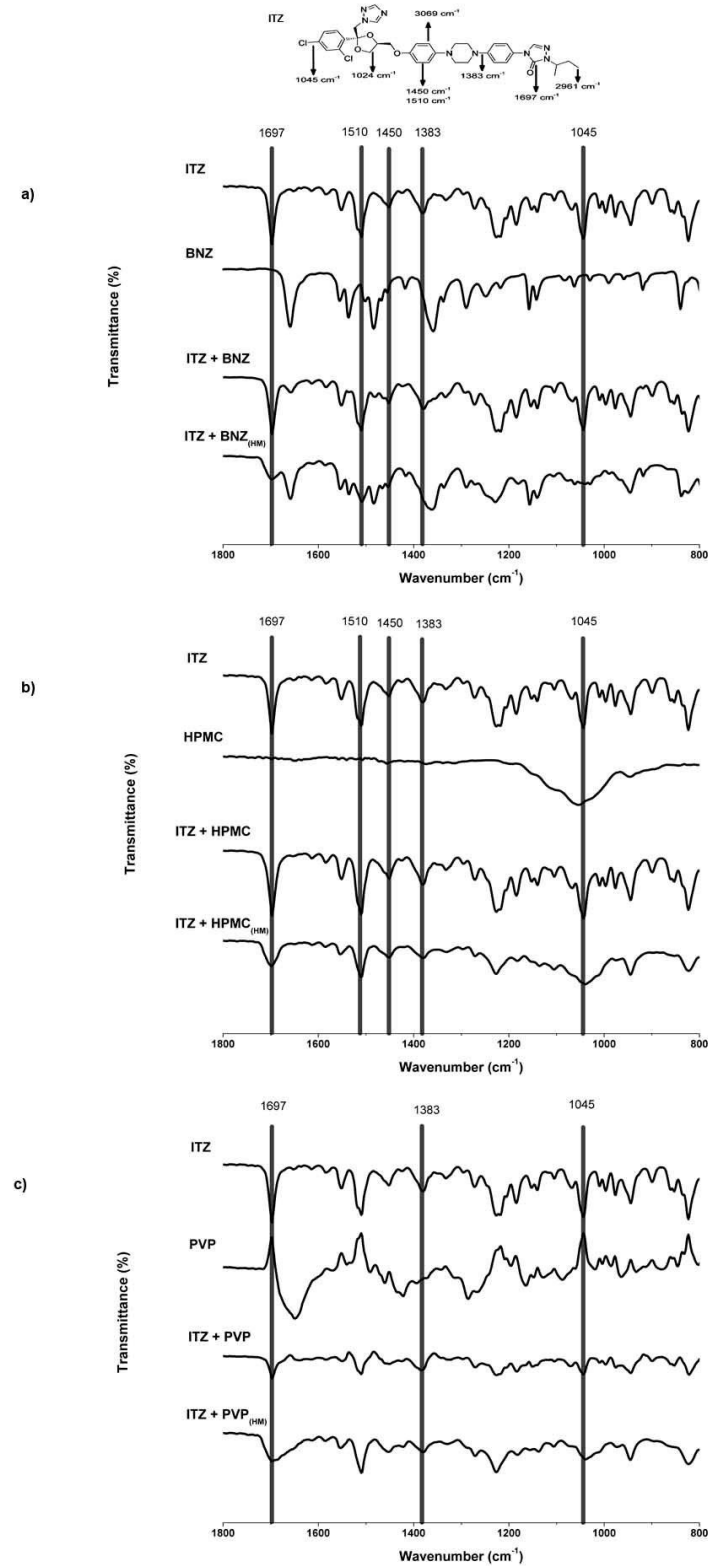


Figura 9. Microfotografias das misturas físicas (PM) e misturas aquecidas (HM) de ITZ com BNZ, HPMC e PVP. (6X).

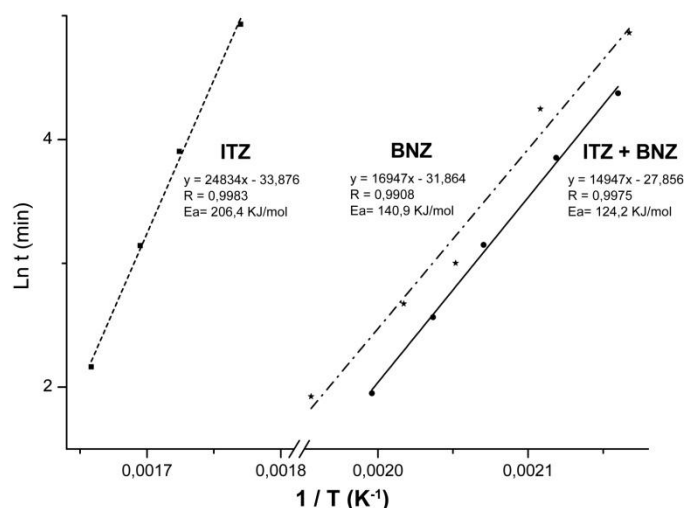
Gráfico 3: Estrutura química de ITZ e espectros de FT-IR de ITZ e suas misturas físicas (PM) e aquecida (HM) com BNZ (a), HPMC (b) e PVP (c). As linhas verticais indicam comprimentos de onda característicos de ITZ.



Estudos de termogravimetria isométrica foram realizados para determinar a energia de ativação (E_a) envolvida na decomposição de cada fármaco separadamente e em conjunto (**Gráfico 4**). Coeficientes de correlação dos dados experimentais foram encontrados com valores acima de 0,99. Uma energia de ativação de 206,4 KJ mol⁻¹ foi determinada a partir do processo de decomposição de ITZ, enquanto que o processo de degradação de BNZ começou a uma temperatura inferior de cerca de 100°C e envolveu uma energia de ativação de 140,9 kJ mol⁻¹.

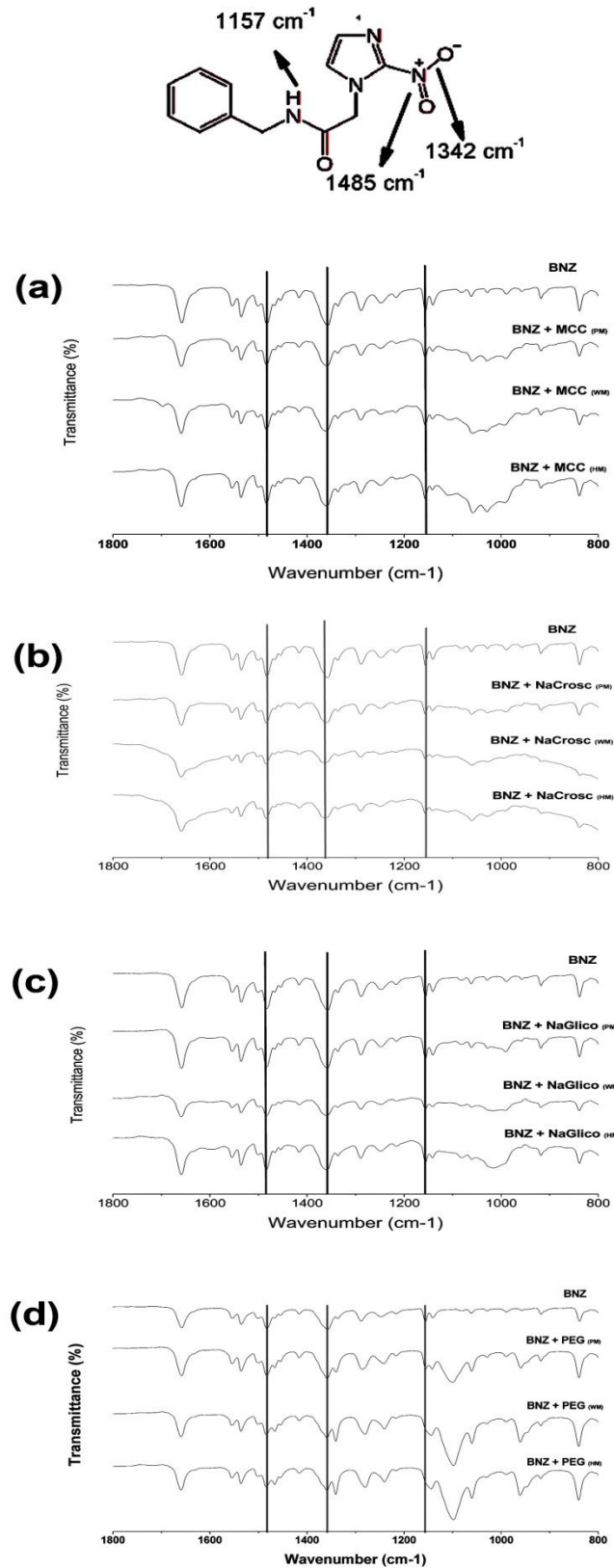
Na amostra com a mistura binária, a presença de ITZ provocou uma mudança no processo de decomposição de BNZ. Nesta amostra, o processo de degradação começou em uma temperatura mais baixa e a energia de ativação foi reduzida para 124,2 KJ mol⁻¹. Estes resultados corroboram os resultados anteriores, confirmando a incompatibilidade entre ITZ e BNZ.

Gráfico 4: Curvas de Arrhenius de BNZ, ITZ e em mistura física (PM) obtidos dos estudos de termogravimetria isométrica:



O **Gráfico 5** mostra os espectros de FTIR de misturas binárias de BNZ com excipientes selecionados (MCC, NaCrosco, NaGlico e PEG), tal como foi salientado, todas as bandas correspondente aos grupos funcionais característicos da molécula de BNZ não parecem ter sido alterados em razão das misturas com os excipientes. Nenhum sinal de degradação é observado. Com base nestes resultados, o MCC, NaCrosco, NaGlico e PEG foram considerados compatíveis e foram utilizados em formulações de péletes.

Gráfico 5. Espectros de FTIR de BNZ e misturas (PM, WM e HM) com CMC (a), NaCrosc (b), NaGlico (c) e PEG (d). As linhas verticais indicam comprimentos de onda característicos de BNZ:



4.1.4. Conclusão

Todos os excipientes testados, β CD, HP β CD, MgSt e RM β CD, mostraram ser compatíveis com ITZ, e que são capazes de ser integrado em formulações com este fármaco. Os tratamentos que as amostras foram submetidas, em especial o processo de umedecimento, provaram que há suspeita de incompatibilidade de ITZ com alguns materiais. Neste contexto, os excipientes PVP e HPMC mostraram evidência de modificações físicas e químicas, quando combinados com ITZ e foram consideradas incompatíveis com neste estudo. Além disso, verificou-se que a associação entre a droga ITZ e BNZ é potencialmente instável. Estes fármacos apresentaram uma maior interação térmica, com importantes repercussões sobre a sua estabilidade física e química. Assim, novas pesquisas sobre tecnologias alternativas são necessárias para permitir formulações de ambas os fármacos, evitando o seu processamento industrial em conjunto, para obter uma forma farmacêutica que está em conformidade com a estabilidade e requisitos de eficácia estabelecida pelas Agências Reguladoras.

5. CAPÍTULO 2

5. CAPÍTULO 2

Para desenvolvimento de uma terapia combinada, a partir dos resultados encontrados nos estudos de pré-formulação, percebeu-se a necessidade da formulação em separado de ITZ e BNZ. Para desenvolvimento da formulação de BNZ, seguiu-se o seguinte estudo:

5.1. Desenvolvimento de péletes de BNZ preparados por extrusão-esferonização para melhoramento do seu perfil de dissolução

5.1.1. Introdução

A terapia disponível para tratamento da Doença de Chagas é baseada na administração de benznidazol (BNZ), uma droga pouco solúvel e pouco permeável cujos efeitos colaterais podem levar à interrupção do tratamento (URBINA, 2009). Dentro do contexto da busca de uma alternativa para o tratamento da Doença de Chagas, diferentes técnicas para elaboração de forma farmacêutica mais eficiente foram pesquisadas, dentre elas a utilização de terapia combinada de ITZ e BNZ (MAXIMIANO, *et al.*, 2010; APT, 2003; URBINA, 2009; STRAUSS, *et al.* 2013).

Os problemas com solubilidade têm sido avaliados e tentativas de melhoramento da formulação com o uso de técnicas de microprecipitações têm levado ao aumento da solubilidade (RASENACK, N. e MULLER, B. W.; 2003; MAXIMIANO, *et al.*, 2011). A técnica de microcristalização envolve troca de solventes, polares e apolares, e utilização de polímeros foi realizada para aumentar a solubilidade do Itraconazol e apresentou bons resultados (MILLER, *et al.*, 2010). Por esta razão, a incorporação destas técnicas de microprecipitação incorporadas ao desenvolvimento de nova forma farmacêutica pode melhorar a solubilidade e permeabilidade de ITZ e BNZ.

De forma complementar, a formulação de sistemas de multiparticulados é altamente recomendada para desenvolver formas farmacêuticas para combinações de fármacos. Isto, com fins de evitar incompatibilidades entre compostos e facilitar as preparações com diferentes proporções de fármacos combinados. Dentre as formas farmacêuticas multiparticuladas, os péletes são amplamente utilizados como matrizes de liberação controlada, também sendo possível obter a liberação rápida do fármaco a partir desses sistemas através da utilização de um adjuvante farmacêutico capaz de desintegrar a matriz (DUKIC-OTT, *et al.*, 2007; SOUTO, *et al.*, 2005; GOYANES, *et al.*, 2010; BENCHAWAN, C., PORNSAK, S., 2013).

Portanto, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de péletes de BNZ que permitem a liberação do ativo mais rapidamente e podem ser incorporadas em futuros protocolos para o tratamento da Doença de Chagas com combinação de dose fixa de BNZ e ITZ.

5.1.2. Material

O princípio ativo benznidazole (BNZ; lote 13871) foi obtido a partir de Roche (Basiléia, Suíça). Foram utilizados excipientes grau farmacêutico dos seguintes: Polietilenoglicol 6000 (PEG, lote 200682A, Casa da Química, São Paulo, Brasil) Glicolato amido de sódio (NaGlico, lote XB2034, Casa da Química, São Paulo, Brasil), Celulose microcristalina PH 101 (CMC, lote, C1007046, Via Farma, São Paulo, Brasil) e Croscarmelose sódica (NaCrosc, lote 2060890, Genix Farmaceutica, Anápolis, Brasil). Adicionalmente, foram utilizados etanol absoluto (Casa da Química, Brasil), água purificada e Ácido clorídrico 0,1N (Casa da Química, Brasil).

5.1.2. Métodos

Preparação dos microcristais de BNZ

Os microcristais/microprecipitados de BNZ foram preparados usando o método de troca de solvente. Nesta técnica, deve-se verter uma solução polar em uma apolar de modo a precipitar o ativo na presença de um agente estabilizador (MAXIMIANO, *et al*, 2010). Neste processo, o princípio ativo BNZ foi dissolvido em etanol absoluto a uma concentração de 25 mg/mL e uma solução aquosa de PEG 0,1% foram preparadas em béqueres de 900 mL, separadamente. Após completa dissolução, a solução de PEG 0,1% foi vertida rapidamente dentro do recipiente que continha a solução etanólica de BNZ e com agitação constante. Após dois minutos, o precipitado de BNZ foi filtrado por uma membrana de 0,45µm com auxílio de bomba de vácuo. Por fim o produto obtido passou por secagem em estufa por 24 horas a 30°C.

Formulação dos péletes

O desenho experimental foi composto de um conjunto de sete diferentes formulações de péletes (F1 a F7) contendo microcristais BNZ (50% p/p) e CMC (40% p/p). A parte

restante formulação (10% p/p) teve a sua composição determinada por um desenho experimental utilizando misturas proporcionais de NaCrosco, NaGlico e/ou PEG, como mostrado na **Figura 10**.

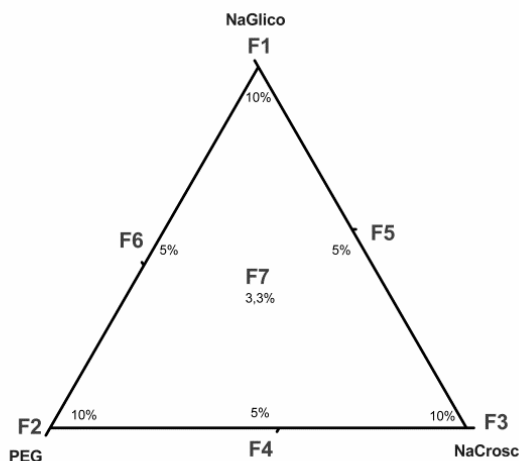


Figura 10. Desenho experimental da mistura dos pílulas contendo BNZ microprecipitado (50 % p/p), CMC (40 % p/p) e diferentes excipientes (NaGlico, NaCrosco e PEG)

Para efeitos de comparação, um segundo conjunto de pílulas de BNZ não tratadas (NT Pellets) contendo BNZ como fornecido (50%), CMC (40%), NaGlico (3,3%), NaCrosco (3,3%) e PEG (3,3%) foram preparadas nas mesmas condições descrito acima.

Todas as formulações foram preparadas pela técnica de peletização por extrusão-esferonização. Os microprecipitados de BNZ foram misturados e malaxados com os excipientes e umidificados com água purificada, utilizada como o solvente de granulação. Em seguida, a massa úmida foi extrusada em extrusor Extruder Caleva20 (Caleva, Reino Unido) operando a 30 RPM e utilizando malha de 0,5 mm. A massa extrusada foi coletada e passou por esferonização em esferonizador Multi Bowl Spherronizer® (Caleva, Reino Unido) por 5 minutos numa velocidade de 1500 RPM. O processo de secagem foi realizado em Estufa de Circulação (Nova Ética, Brasil) durante 24 horas a 40°C.

Caracterização dos péletes

Ensaio de teor de BNZ

Para calcular a quantidade de BNZ incorporada nos péletes, ensaios de teor foram realizados utilizando um método espectrofotométrico validado. O correspondente de 15 mg de BNZ foi dissolvido em 100 ml de etanol absoluto em balão volumétrico e em triplicata. Para auxiliar este processo, a solução passou 15 minutos em banho-maria com ultrassom. Alíquotas de 5,83 mL desta solução-mãe foram diluídas em água etanol absoluto em balão de 50 mL. Esta solução final foi filtrada em membranas de 0,45 μ m e lida em espectrofotômetro de ultravioleta no comprimento de onda de 321 nm (Espectrofotômetro de UV-Vis Shimadzu UV-1800, Japão). Os dados coletados foram inseridos em uma curva de calibração validado previamente validada para inferir os valores reais.

Tempo de desintegração

O ensaio de desintegração foi registrado através de filmagens para possibilitar o acompanhamento do processo. Amostras de 30 g de péletes foram submetidas ao ensaio de desintegração por intermédio de gotejamento de água destilada, a 37°C. Todo o processo foi registrado por filmagem em microscópio Leica (Leica DM E, China) acopladas a uma câmera (Power Shot S80, Canon, Coreia).

Friabilidade

Para os cálculos de friabilidade dos péletes, amostras de 10 g foram misturados com esferas de vidro (10 g) e colocados em friabilômetro Nova Ética, modelo 300 (Nova Ética, Brasil). As Amostras foram erodidas por 5 minutos com velocidade de 25 RPM. Após o processo, a massa dos péletes intactos foi pesada e o índice de friabilidade foi calculado como sendo a percentagem de peso perdido no presente processo.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Microfotografias foram feitas usando um equipamento de microscopia eletrônica de varredura JEOL JSM 840-A (JEOL, Estados Unidos da América), equipado com um segundo detector de elétrons trabalhando em 15 KeV. Os planos das fotografias foram realizados tomando fotos dos péletes inteiros e seccionados radialmente com auxílio de lâminas de aço. Todos os péletes de cada uma das formulações foram fixadas em *stubs* de latão e revestidas com camadas de platina.

Análise óptica de imagem

As formas e tamanhos dos péletes foram avaliados utilizando um microscópio estereoscópico Leica DME[®] (Leica DM E, China) conectado à câmera de vídeo CyberShot S300 (Sony, Japão). Os diâmetros médios de Feret e aspectos foram anotados e analisados. A circularidade dos péletes foi determinada utilizando a Equação nº 1. Cerca de 300 péletes de cada formulação foram examinados. As imagens foram processadas utilizando software Image-Pro-Plus[®] (EUA).

Equação nº 1:

$$C = 4\pi A/p^2,$$

Onde, “*a*” é área projetada e “*p*” corresponde ao perímetro.

Teor de umidade

As avaliações do teor de umidade dos péletes de BNZ foram realizadas utilizando uma termobalança Shimadzu DTG-60 (Shimadzu, Japão). Cerca de cinco gramas de cada amostra foram pesadas em cadinhos de platina e aquecidas a 105°C sob um fluxo de gás nitrogênio de 50 mL min⁻¹ até que a redução de massa permaneceu estável. A percentagem de peso perdido no processo de aquecimento foi inferida como sendo a perda de água na amostra, ou seja, o seu teor de umidade.

Índice de compressibilidade

O índice de compressibilidade foi determinado por meio da análise da densidade de compactação. Para tanto, uma proveta de 10 mL foi preenchida com péletes e, em seguida, por meio de movimentos repetitivos, compactou-se a massa até que o volume permaneceu-se estável. Os índices de compressibilidade (IC) foram calculados usando a Equação 2:

Equação 2:

$$IC = 100 \times (dt - da) / dt,$$

Onde, “*da*” é o densidade inicial e “*dt*” é o densidade final após compactação.

Perfil de dissolução

Os péletes de todas as formulações foram pesados de acordo com os resultados do ensaio de teor de BNZ a fim de obter amostras contendo 50 mg de BNZ que garantam condições de imersão, ou seja as condições *sink*. Estudos de dissolução foram realizados com 900 mL de HCl 0,1 N, utilizando o método de pás (aparelho USP II) a 75 RPM na temperatura de $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Em intervalos de tempo regulares (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) cinco mililitros de amostra foram retirados, filtrados e lidos em espectrofotômetro de UV a 321 nm (Espectrofotômetro de UV-Vis Shimadzu UV-1800[®], Japão). As concentrações de fármaco dissolvido foram determinadas utilizando um método espectrofotométrico previamente avaliado. Cada formulação de péletes foi analisada em triplicata.

5.1.3. Resultados e discussões

No processo de extrusão-esferonização, é essencial que a formulação tenha plasticidade adequada fazer uma que a massa de extrusão se rompa homogeneamente durante a esferonização. Para alcançar esta condição, a adição de celulose microcristalina em 40% da massa seca total conferiu plasticidade necessária para o processo de peletização. O desenho experimental da mistura foi voltado para a avaliação da incorporação de agentes desintegrantes, como por exemplo, a NaCrosc e NaGlico, e o agente tensoativo Polietilenoglicol (PEG) para diminuir o tempo de desintegração e aumentar a extensão dos perfis de dissolução de péletes formulados por extrusão-esferonização DUKIC-OTT, *et al*, 2007; SOUTO, *et al*, 2005; GOYANES, *et al*, 2010; BENCHAWAN, C., PORNSAK, S., 2013).

O BNZ utilizado nas formulações foi previamente microprecipitado utilizando uma técnica de troca de solventes para melhorar a baixa solubilidade em água da droga e melhorar as suas propriedades de dissolução.

A caracterização físico-química de péletes é mostrada na **Tabela 5**. Os péletes contendo BNZ microprecipitado apresentaram um teor de cerca de 40% de BNZ, já os péletes contendo BNZ não tratados apresentaram um teor de fármaco de 33%. Todos os péletes de BNZ apresentaram teor de umidade residual igual ou inferior a 2%, indicando que a secagem ocorreu em um processo de forma apropriada.

Tabela 5. Avaliação físico-química de péletes de BNZ. Os desvios padrão estão em parênteses.

Amostra	Teor (%)	Friabilidade (%)	Teor de umidade (%)	Tempo de desintegração (s)	Índice de compressibilidade (%)
NT Pellets	33,6 (0,39)	0,3	1,4	115	5,0
F1	40,7 (1,02)	0,8	2,0	60	2,0
F2	39,9 (1,28)	1,3	0,3	360	4,0
F3	41,9 (1,33)	0,6	1,8	1	6,0
F4	41,4 (0,14)	1,4	1,4	1	7,2
F5	41,5 (0,50)	1,6	1,6	500	4,0
F6	39,1 (1,79)	0,3	1,1	180	5,0
F7	41,1 (0,64)	0,8	1,1	10	3,0

Os dados friabilidade apresentaram resultados satisfatórios dentro do limite de 1,6% em todas as formulações (**Tabela 5**). Percebe-se que as formulações que contêm NaGlico (F1, F6 e F7) mostraram friabilidade inferior (0,8; 0,3 e 0,8, respectivamente). Como esperado, todas as formulações de péletes apresentaram excelentes propriedades de fluxo, já que os índices de compressão encontrados foram inferiores a 7% (SAHAH, *et al*, 2008).

A determinação do índice de compressibilidade é uma aproximação para a vibração que ocorre normalmente em equipamentos industriais. Uma forma farmacêutica friável produzirá mais frações durante essa vibração, promovendo dificuldades ao fluxo. Consequentemente apresentará elevado índice de compressibilidade. Entretanto, em algumas situações não é possível utilizar este raciocínio como, por exemplo, neste trabalho. Visto que todas as formulações apresentaram excelentes propriedades de fluxo, já que apresentam IC < 7,2%.

Os resultados do tempo de desintegração mostraram uma desintegração instantânea de F3 e F4 (<1s) e desintegração rápida em F7 (<10s) (**Tabela 5**). Por outro lado, formulação F2, F5 e F6 apresentaram resultados menos significativos para este parâmetro.

As fotomicrografias de péletes de BNZ são mostradas na **Figura 11**. Da análise das imagens nota-se que o formato cilíndrico é predominante entre todas as formulações. Este padrão se repete em cada uma das formulações, com exceção das formulações F6 e F7. Estas duas formulações têm quantidade igualmente comparável de péletes esféricos e cilíndricos tal como os dados das análises de formas dos péletes são apresentados na **Tabela 6**.

As formulações F6 e F7, bem como F2, apresentaram dados de circularidade e aspecto mais próximos a valor ideal, isto é o valor 1, do que as outras formulações. Uma possível

explicação para esta observação pode ser relacionada com a presença de PEG em todas estas três formulações, já que este ingrediente melhora a plasticidade das formulações (ROWE, *et al*, 2009).

Figura 11. Fotomicrografias das formulações de péletes tomadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) nas amplitudes de 20X (a), 80X (b); secção transversal 80X (c) e 200X (d):

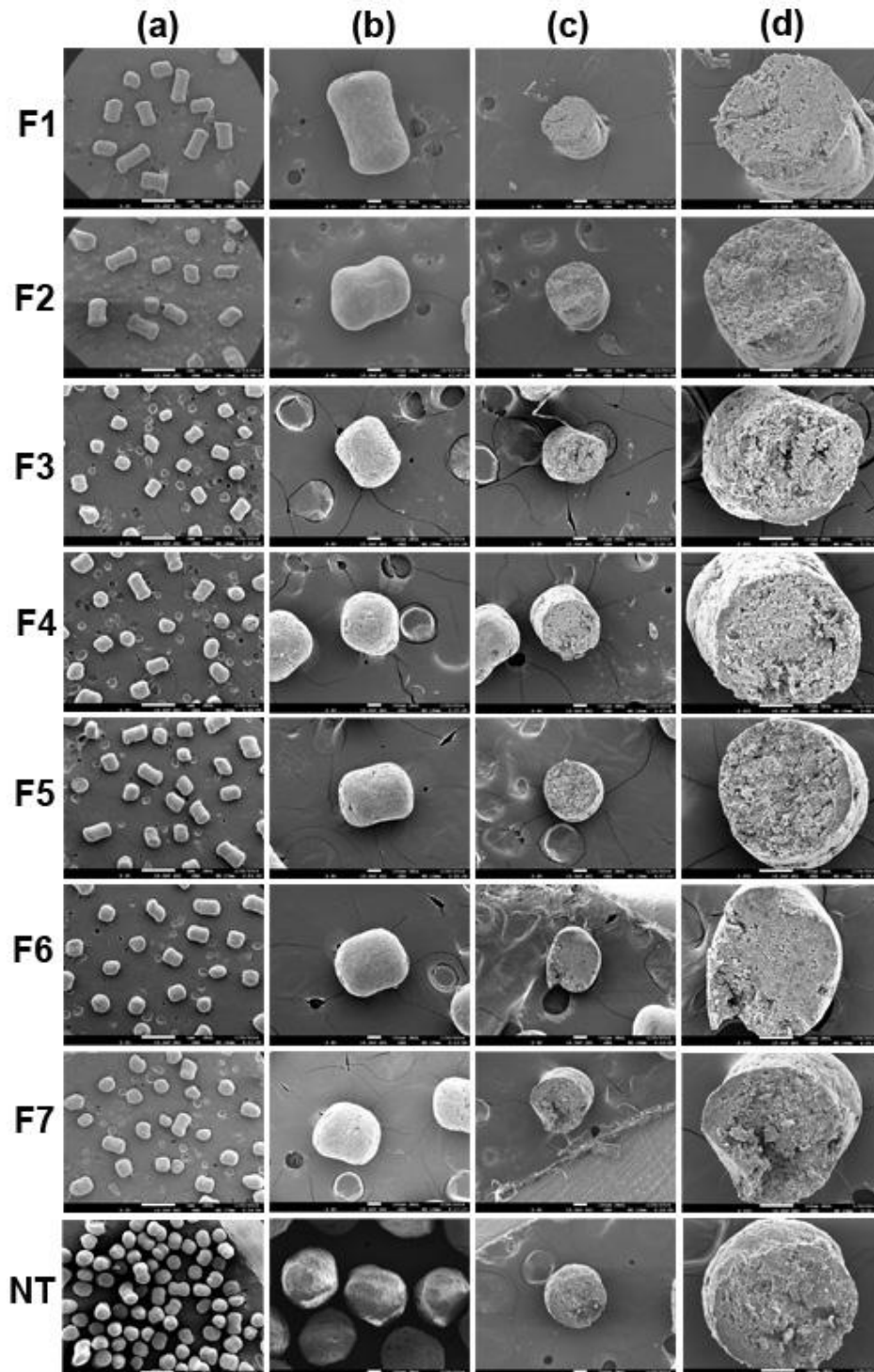


Tabela 6. Diâmetro médio de Feret, aspecto e circularidade dos péletes de BNZ. Os desvios padrões estão entre parênteses.

Amostra	Diâmetro de Feret (µm)	Aspect	Circularity
Péletes não tratados (NT)	779,99 (0,01)	1,41 (0,28)	0,80 (0,75)
F1	653,15 (0,02)	1,60 (0,64)	0,74 (0,10)
F2	572,20 (0,01)	1,28 (0,32)	0,81 (0,07)
F3	478,52 (0,01)	1,32 (0,23)	0,81 (0,06)
F4	530,19 (0,01)	1,41 (0,27)	0,78 (0,08)
F5	604,31 (0,01)	1,39 (0,29)	0,79 (0,06)
F6	578,56 (0,01)	1,32 (0,25)	0,82 (0,06)
F7	548,73 (0,01)	1,31 (0,26)	0,81 (0,06)

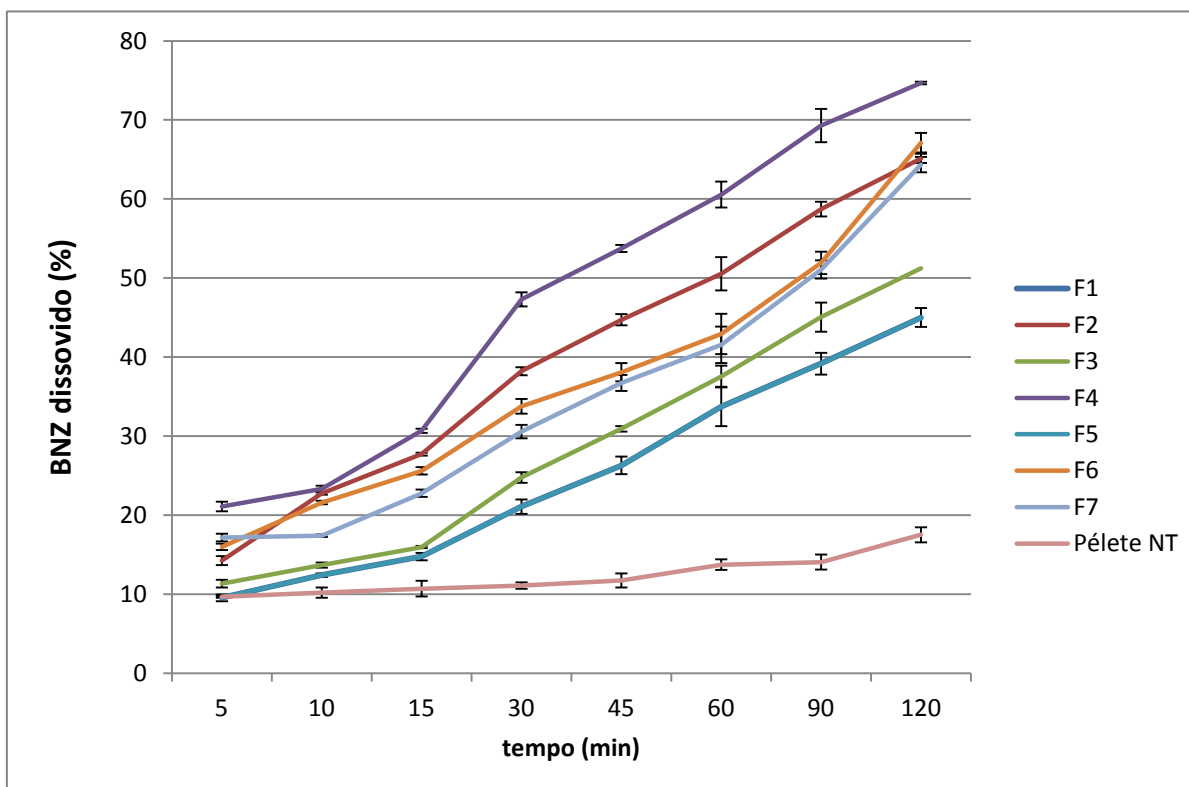
As avaliações da imagem, incluindo diâmetro médio de Feret, aspecto e circularidade apresentaram resultados muito semelhantes. Muito embora, os dados informam que os péletes não são esféricos dado sua circularidade não estar muito próxima ao valor 1,00, não houve prejuízo relacionado com as suas propriedades de fluxo, conforme exposto pelos excelentes dados encontrados para os índices de compressibilidade das formulações (**Tabela 5**).

Os dados dos perfis de dissolução foram tratados para que os desvios padrões e médias de dissolução de cada uma das formulações fossem representados no gráfico. Como pode ser visto no **Gráfico 6**, as formulações de péletes de BNZ microprecipitado têm diferentes perfis de dissolução, variando com a sua composição. Os resultados de dissolução mais rápidos foram encontrados para as formulações de F4, seguidos pelas formulações F2, F6 e F7. A introdução de NaGlico nas formulações parece reduzir o desempenho na dissolução dos péletes, quando comparados aos péletes que contêm PEG e NaCros. As formulações F1 e F5, que contém este componente, apresentaram os desempenhos de dissolução menos significantes e tempos de desintegração mais lentos. O desempenho inferior destas formulações também pode ser relacionado ao tamanho de partícula, pouco maiores quando comparados com os outros péletes (Tabela 3).

As formulações de péletes com BNZ microprecipitados apresentaram um desempenho muito superior em comparação com péletes contendo fármaco não tratado (NT). Enquanto F4 dissolve mais do que 70% da dose em duas horas, péletes (NT) dissolvem apenas cerca de 10% no mesmo intervalo. Estes dados encontrados corroboram com os dados colhidos na literatura e demonstram que a técnica de precipitação pela técnica de troca de solventes

associada à utilização de péletes por extrusão-esferonização, são capazes de superar os problemas de solubilidade do benznidazol (MAXIMIANO, 2011).

Gráfico 6. Perfis de dissolução dos péletes de BNZ, preparados com BNZ microprecitado (F1 a F7) e BNZ sem tratamento (NT) em condições *sink*.



5.4. Conclusão

A técnica de extrusão-esferonização permitiu a fabricação de péletes BNZ com características físico-químicas adequadas. Os péletes com formatos cilíndricos obtidos apresentaram excelentes características de fluxo. O processo de manipulação não afeta a rápida dissolução dos péletes de BNZ microprecitados obtidos pelo método de mudança de precipitação no solvente.

O delineamento experimental provou ser uma ferramenta útil para acessar os atributos de desempenho de agentes desintegrantes e agentes tensoativos na formulação. Os excipientes Croscarmelose sódica e Polietilenoglicol demonstraram um melhor desempenho na desintegração e dissolução de péletes de BNZ.

Portanto, o desenvolvimento de péletes de BNZ microprecipitado, incluindo desagregantes e tensoativos, permitem a liberação do ativo mais rapidamente e podem ser incorporadas em futuros protocolos para o tratamento da Doença de Chagas com combinação de dose fixa de BNZ e ITZ.

6. CAPÍTULO 3

6. CAPÍTULO 3.

Para dar continuidade dos estudos para elaboração de terapia combinada para o tratamento da Doença de Chagas, estudos de formulação do fármaco itraconazol. Desta forma, a seguir descreve-se o delineamento de sistema multiparticulados de ITZ microprecipitado.

6.1. Obtenção de péletes a partir de microcristais de itraconazol para tratamento da doença de Chagas

6.1.1. Introdução

O itraconazol (ITZ) pertence a uma classe de antifúngicos triazólicos caracterizados pela sua alta lipofilicidade, boa absorção oral e extensa distribuição nos tecidos. Suas propriedades físico-químicas incluem pKa igual a 3,7 (apresenta-se ionizado no suco gástrico), coeficiente de partição de 5,7 em pH 8,1 (alta lipofilicidade) e solubilidade aquosa inferior a 5µg/mL em soluções ácidas diluídas (HEYKANTS *et al.*, 1989; LUEHRING, 2012).

Recentemente, estudos científicos têm apresentados resultados animadores acerca da utilização de ITZ no tratamento de infecções causadas pelo *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, seja em terapia monodroga (APT *et al.*, 2013) ou em associações com outros fármacos (CONORADO *et al.*, 2006; LUEHRING, 2012). A utilização deste fármaco nos protocolos do presente estudo se justificam pela expiração da patente comercial e pela disponibilidade da matéria-prima que possibilitam o uso em novos protocolos de tratamento.

Uma vez que este fármaco possui características físico-químicas de baixa solubilidade em água e alta lipofilicidade alguns estudos descrevem alternativas tecnológicas para melhorar a solubilidade aquosa do ITZ, entre elas, a utilização de técnicas de microprecipitação em presença de polímeros hidrofílicos (RASENAC *et al.*, 2002; VERRECK *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2010).

De forma semelhante ao capítulo anterior, o desenvolvimento de formulação de ITZ se direcionou para a produção de sistema multiparticulados para a combinação com BNZ na terapia combinada para o tratamento da Doença de Chagas.

Dessa maneira, o presente estudo apresenta como proposta a elaboração de péletes de liberação imediata por extrusão-esferonização a partir de ITZ microprecipitados previamente obtidos.

6.1.2. Materiais

O itraconazol empregado nesse estudo (ITZ lote 00569488) foi gentilmente doado pela Janssen Cilag Pharmaceutica (Geel, Bélgica). Foram utilizados também excipientes de grau farmacêutico celulose microcristalina PH 101 (CMC, lote, C1007046, Via Farma, São Paulo, Brasil), Hidroxi-propil-metil-celulose (HPMC, lote 006032, São Paulo, Brasil) e croscarmelose sódica (NaCrosco, lote 2060890, Genix Farmaceutica, Anápolis, Brasil). Solventes de pureza analítica, Etanol e Acetona foram empregados na preparação dos microcristais de ITZ e dos péletes. Os péletes comerciais (Pélete_{Comercial}) de itraconazol em cápsulas de 100 mg foram adquiridos em farmácia de manipulação.

6.1.3. Métodos

Obtenção de microcristais/microprecipitados de ITZ

A microcristalização de ITZ ocorreu através de mudança de polaridade entre solventes provocada pela mistura instantânea de dois líquidos na presença de um agente estabilizante. O HPMC. Duas soluções foram preparadas, a primeira contendo ITZ dissolvido em acetona na concentração de 1,5 mg/mL (fase orgânica), e outra solução aquosa com 0,1 % de HPMC (fase aquosa). A solução aquosa foi vertida rapidamente na solução de ITZ sob agitação magnética. O precipitado de ITZ formado foi filtrado (0,45 µm) e seco em estufa por 24 horas a 30°C (ITZ_{mcp}). Testes espectrofotométricos adicionais para verificação do teor foram realizados para averiguação da formação dos microprecipitados (MAXIMINIANO *et al.*, 2011).

Preparação dos péletes de ITZ

Os péletes de microcristais de ITZ (Pélete_{mcp}) foram obtidos utilizando 20% (m/m) de ITZ_{mcp}, 15% (m/m) de NaCrosco e 65% (m/m) de CMC. Essa proporção foi escolhida, primeiramente para efeitos de comparação com a formulação comercial, que apresenta teor de cerca de 20% de ITZ. Por conseguinte, a quantidade de a quantidade celulose microcristalina foi definida alinhando-se as informações encontradas na literatura (SANTOS, 2004) e a quantidade de croscarmelose sódica acompanha a proporção utilizada nos estudos anteriores com BNZ.

A massa do granel foi preparada com água purificada como líquido de umectação. Esta massa úmida foi extrusada em malha de 0,5mm em extrusor Extruder 20 Caleva[®]

(Caleva, Reino Unido) a 30 rpm e posteriormente, esferonizada em esferonizador Multi Bowl (Caleva, Reino Unido) por 5 minutos a 1500 rpm. A secagem da formulação foi realizada a 40°C por 24 horas em estufa Nova Ética (Nova Ética, Brasil). Para efeitos de comparação, outra formulação contendo ITZ não microcristalizado (Pélete_{pa}) foi preparada da mesma forma descrita acima, todavia empregando 20% (m/m) de ITZ não tratado, 15% (m/m) de NaCroc e 65% (m/m) de CMC.

Caracterização dos péletes

Doseamento

Amostras correspondentes a 15 mg de ITZ foram utilizada para preparar uma solução estoque na concentração de 150 µg/mL usando etanol/HCl 0,2M (70:30 v/v) com auxílio de banho ultrassônico. Uma diluição a partir da solução estoque foi efetuada no mesmo veículo, estabelecendo a concentração de trabalho em 17,5 µg/mL. O método foi validado segundo especificações da ANVISA (ANVISA, 2003).

Desintegração

O ensaio de desintegração foi registrado através de filmagens para possibilitar o acompanhamento do processo. Amostras de 30 g de péletes foram submetidas ao ensaio de desintegração por intermédio de gotejamento de água destilada, a 37°C. Todo o processo foi registrado por filmagem em microscópio Leica (Leica DM E, China) acopladas a uma câmera (Power Shot S80, Canon, Coreia).

Friabilidade

Amostras de péletes (10 g), em presença de esferas de vidro de diâmetro de 0,5 mm (10g), passaram por abrasão em friabilômetro (Nova Ética, Brasil) durante 5 minutos e em velocidade de 25 RPM. O índice de friabilidade foi calculado como o percentual de peso dos péletes perdido no processo, de acordo com a Equação n° 3:

Equação n° 3:

$$IF = \frac{M_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Onde: “*IF*” significa índice de friabilidade, “*m_f*” massa final, “*m_i*” massa inicial.

Microscopia eletrônica de varredura

Microfotografias eletrônicas de varredura foram tiradas usando microscópio JEOL JSM 840-A (JEOL, Estados Unidos da América) equipado com um segundo detector a 15 KeV. Péletes inteiros e cortados transversalmente foram montados em suportes de latão e fixados com banho de revestimento de platina.

Análise de imagem

Os tamanhos médios e formas foram analisados utilizando estereomicroscópio Leica DME (LEICA, China) conectado à câmera fotográfica CyberShot S300 (Sony, Japão). Os diâmetros médios de Ferret e os aspectos foram coletados e avaliados. A circularidade dos péletes foi determinada utilizando a Equação nº 4. Cerca de 300 péletes de cada formulação foram examinados. As imagens foram processadas utilizando o software Image Pro-Plus® (Pro-plus, EUA).

Equação nº 4:

$$C = 4\pi A / p^2,$$

onde, “A” é a área projetada e “p” corresponde ao perímetro.

Teor de umidade

As avaliações de teor de umidade dos péletes foram realizadas utilizando uma termobalança Shimadzu DTG-60 (Shimadzu, Japão). Cinco gramas de cada amostra foram pesados em cadinhos de platina e aquecidos 105°C sob fluxo de gás nitrogênio de 50 mL min⁻¹ até que a perda de massa se tornou estável. O percentual de perda de peso devido ao processo de aquecimento foi atribuído à perda de água na amostra.

Índice de compressibilidade

O índice de compressibilidade foi determinado baseando se na densidade do granel e densidade de compactação. Desta forma, uma proveta de 10 mL foi preenchida com péletes e depois compactada até que o volume se mantivesse estável. O índice de compressibilidade (IC) foi calculado pela **Equação nº 2:**

Perfil de dissolução

Os péletes foram precisamente pesados de acordo com os ensaios de teor de ITZ para se obter 15 mg de ITZ, a qual assegura as condições sink (OVERHOFF *et al.*, 2007). Os estudos de dissolução foram realizados utilizando 900 mL de HCl 0.1 N e pás (USP apparatus II) sob agitação de 75 rpm a 37 ± 0.5 °C. Em intervalos regulares de tempo (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) amostras foram retiradas e filtradas. As concentrações de fármaco dissolvidas foram determinadas utilizando método espectrofotométrico previamente validado. Todas as formulações de péletes foram analisadas em triplicata.

6.1.4. Resultados e Discussões

Estudos previamente realizados (Capítulo 1) apontaram incompatibilidade entre ITZ e HPMC em misturas binárias equimassa. Contudo, a obtenção de microcristais de ITZ, segundo descreve-se na literatura (RASENAC *et al.*, 2002), apresenta resultados de velocidade de dissolução mais favoráveis quando empregado o polímero HPMC como agente estabilizante, em comparação com outros polímeros testados. Uma vez que os ensaios de teor de ITZ nos microcristais deram resultado de 92,32%, acredita-se que essa pequena proporção de HPMC na amostra não afete a estabilidade da formulação. Já que esta proporção é acentuadamente menor que a quantidade utilizada para simulação realizada nos testes de préformulação.

Os resultados das análises físico-químicas dos péletes de ITZ são mostrados na **Tabela 6**. Neles se observa que os tanto os péletes de itraconazol não tratado, como os péletes formulados com ITZ microprecipitado, apresentam teor de dentro da faixa esperada (18,17% e 18,08%). Desta forma tendo seus teores semelhantes a formulação de péletes de ITZ comercial.

Todas as três formulações de péletes apresentaram resistência mecânica apropriada e umidade residual dentro dos padrões recomendados. Uma vez que os resultados de friabilidade e desintegração são bastante reduzidos (SANTOS, 2004; ROWE, 2009). Conforme planejado, os péletes de ITZ microprecipitado e ITZ não tratado (pa) tiveram rápidas desintegrações, tendo sido completadas em alguns segundos (6 e 2 segundos, respectivamente). Esta evidência pode ser associada a formulação com NaCroscl, que facilita destruição da matriz do pélete de celulose (BENCHAWAN, C. & PORNSAK, 2013). Não

obstante nota-se que os índices de compressibilidade dos péletes encontrados, podem, conferir as excelentes características de fluxo desse tipo de granulado (SANTOS, 2004). Desta forma, a comparação entre os péletes de ITZ microprecipitado e ITZ não tratado (pa) com os péletes comerciais leva a conclusão que ambas formulações apresentam dados de propriedades físico-químicas satisfatórias.

Tabela 6. Análise das propriedades físico-químicas dos péletes de ITZ. Desvio padrão em parênteses.

Amostra	Teor (%)	Friabilidade (%)	Umidade (%)	Desintegração (s)	Índice de Compressibilidade (%)
Pélete _{pa}	18,17 (0,48)	1,37	3,66	6	6,0
Pélete _{mcp}	18,08 (0,57)	0,28	3,52	2	6,0
Pélete _{comercial}	18,25 (0,22)	0,17	1,05	1	3,0

A **Tabela 7** mostra os resultados da análise de imagem dos péletes de ITZ. Pode-se observar que os péletes produzidos no presente estudo apresentam tamanho cerca de duas vezes menor que os péletes de ITZ comercializados. Uma vez que os valores de diâmetro das partículas são bastante reduzidos, esta característica pode auxiliar com a fluidez necessária para o transporte e transferência nas máquinas de enchimento, eliminando problemas com variações de quantidade envasada e garantindo uniformidade de conteúdo. Além de facilitar os processos de revestimento e facilitar misturas com outros péletes. (KANDUKURI, 2009).

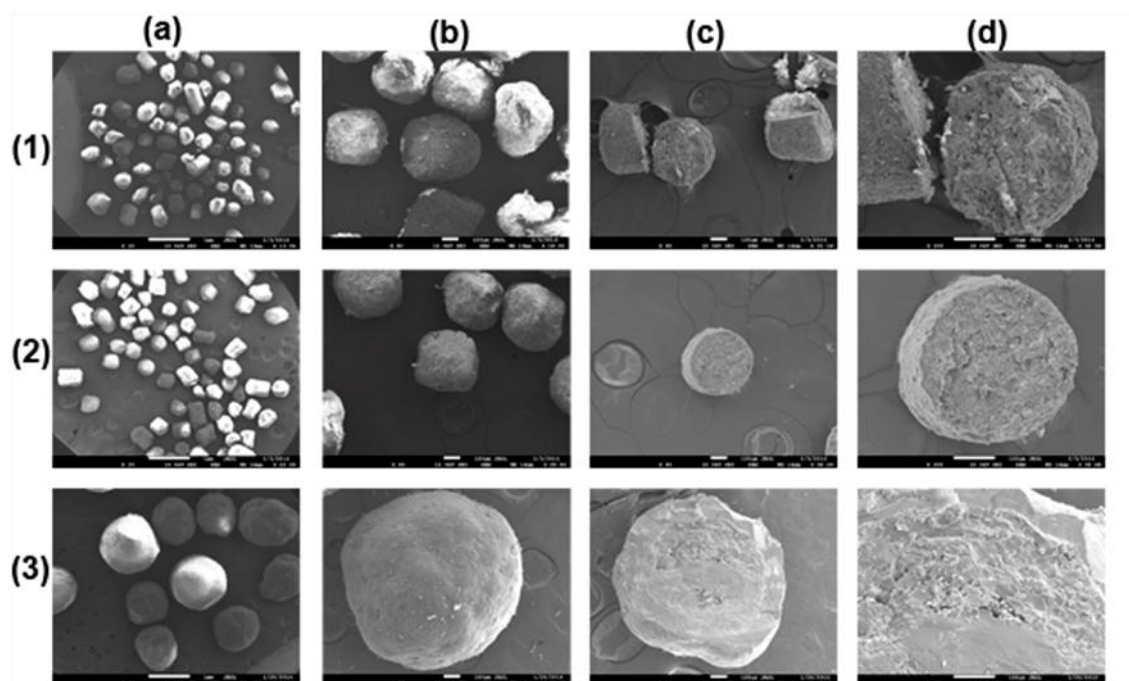
Muito embora os péletes de ITZ com microprecipitados apresentaram fatores de forma (aspecto e circularidade) diferentes do valor ideal para se caracterizar como uma partícula esférica (valor ideal = 1,00) e que os dados estatísticos definem que não há grande variação nestes padrões (já que os desvios padrões são baixos), os dados de tamanho de partícula e de *Índice de compressibilidade* encontrados na Tabela 6 se sobressaem na avaliação da propriedade de fluxo dos péletes. Os dados de *Índice de complexibilidade* encontrados, inclusive, definem que os péletes produzidos apresentam excelente propriedade de fluxo, mesmo sendo em sua maioria de formato cilíndrico (AULTON, 2005.)

Tabela 7. Análise de imagem dos péletes de ITZ realizadas a partir de microscopia óptica. Desvio padrão em parênteses.

Amostra	Diâmetro médio de		
	Feret (μm)	Aspecto	Circularidade
Péletes _{pa}	417,96 (0,007)	1,25 (0,21)	0,828 (0,05)
Péletes _{mcp}	447,03 (0,006)	1,21 (0,18)	0,853 (0,05)
Péletes _{comercial}	883,06 (0,007)	1,20 (0,10)	0,989 (0,01)

As fotomicrografias tomadas em microscópio eletrônico de varredura (**Figura 12**) mostram que os péletes obtidos possuem um aspecto menos cilíndricos que os péletes de BNZ estudados no Capítulo 2. Todavia, percebe-se que os mesmos tem formas arredondadas, mas não uniformes. A análise das figuras mais aproximadas revela que os péletes de ITZ comercial possuem conformação diferente dos péletes de ITZ microprecipitado e não tratado. A imagem 3 (a) da Figura 12 mostra que os mesmos se apresentam em camadas, além de esteticamente se apresentarem mais arredondados.

Figura 12. Fotomicrografias das formulações de péletes (1) Pélete_{pa}; (2) Pélete_{mcp}; (3) Pélete_{comercial}, tomadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) nas amplitudes de 20X (a), 80X (b); seção transversal 80X (c) e 200X (d).:



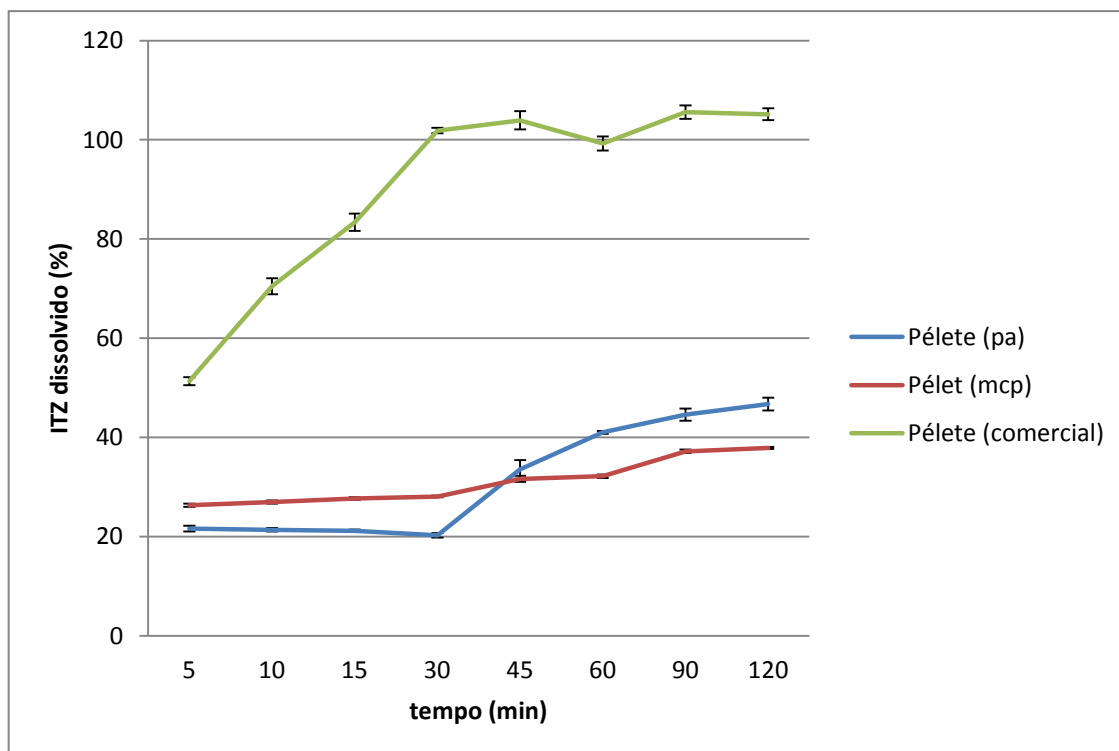
Os perfis de dissolução dos péletes de ITZ são mostrados no **Gráfico 7**. Os resultados apresentam considerável aumento da dissolução do itraconazol, visto que o princípio ativo é possui reduzida solubilidade inferior a $5\mu\text{g/mL}$ em soluções ácidas diluídas em temperatura ambiente (HEYKANTS *et al*, 1989; LUEHRING, 2012).

Todavia, ambas as formulações de péletes de ITZ apresentaram perfil de dissolução com reduzida velocidade de solubilização do fármaco. Isso ocorreu tanto com os péletes elaborados com microcristais de ITZ, quanto com o ITZ não modificado. Ambas as amostras dissolvem menos que 50% de ITZ durante as duas horas do teste (cerca de 46% de ITZ dissolvido na formulação de pélete de ITZ não tratado e 37% nos péletes de ITZ microprecipitado).

De forma semelhante, as formulações elaboradas de péletes possuem desempenhos de dissolução inferiores aos péletes comerciais de ITZ. Uma vez que a formulação comercial dissolve toda a quantidade de ITZ nos primeiro 30 minutos do teste. Esta característica pode estar relacionada com a sua formulação e estrutura morfológica descrita anteriormente, e se apresentando como um grande desafio para próximos estudos.

Os dados encontrados para o perfil de dissolução se contrastam com os dados de tempo de desintegração apresentados na Tabela 6. De fato, estranha-se o fato que os testes de friabilidade não estarem alinhados com a dissolução. Todavia, os testes de desintegração ocorreram logo após a secagem dos péletes, ao contrário dos testes de dissolução, que ocorreram seis meses depois da formulação devido utilização de laboratórios distintos para esta pesquisa. Assim, não invalidando os resultados, teoriza-se que o envelhecimento das amostras pode estar relacionado com os resultados encontrados para dissolução.

Gráfico 7. Perfis de dissolução dos péletes de ITZ, preparados com ITZ microprecitado (Pélet_{mcp}), ITZ não tratado (Pélet_{pa}), comparados com formulação comercial (Pélet_{comercial}) em condições *sink*.



6.1.5. Conclusões

Os péletes elaborados com ITZ possuem características físico-químicas e farmacopêicas adequadas para uma formulação farmacêutica. Devido ao desenho experimental que incluiu NaCrosol na formulação, a desintegração dos péletes de ITZ é praticamente instantânea. Muito embora, tenha ocorrido significativa melhoria na dissolução do princípio ativo, a microprecipitação e peletização do fármaco não promoveram um perfil de dissolução mais rápido quando comparado com a formulação de péletes com ITZ não tratado. De forma similar, o desempenho de dissolução dos péletes elaborados com microcristais de ITZ ainda é inferior ao conseguido pela formulação comercial, o que evidencia a necessidade de aprimoramento desse sistema, especialmente nos minutos iniciais de dissolução.

7. CAPÍTULO 4

7. ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE TÉRMICA DE ITRACONAZOL, BENZNIDAZOL E EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS.

7.1. Introdução

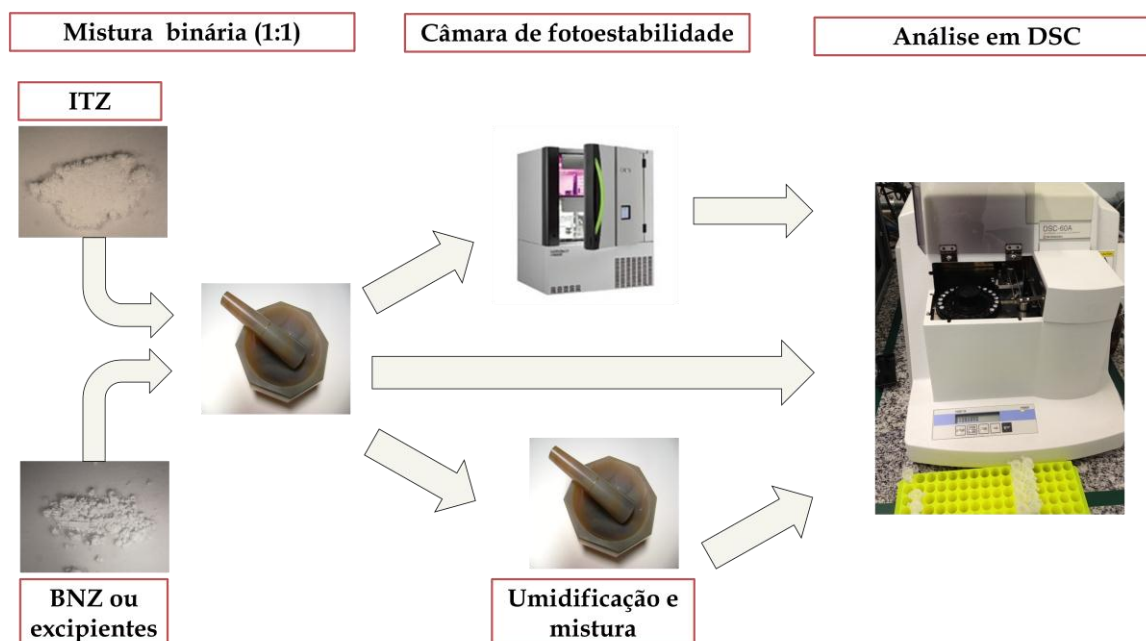
A doença de Chagas constitui um grande problema de saúde na América Latina. O benznidazol (BNZ), o único medicamento disponível para o tratamento, demonstra eficácia e produz diversos efeitos adversos. Recentes estudos têm demonstrado que a associação desse fármaco com o antifúngico itraconazol (ITZ) potencializa sua ação tripanocida.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a compatibilidade entre estes fármacos e outros excipientes farmacêuticos a ser utilizados em uma formulação dose fixa combinada empregando calorimetria diferencial de varredura (DSC).

7.2. Metodologia

Neste estudo foram realizadas análises de DSC nas misturas binárias equimassa entre BNZ, ITZ e excipientes selecionados (hidroxipropil-metil-celulose - HPMC, estearato de magnésio – MgSt, celulose microcristalina- MCC, polivinilpirrolidona – PVP, beta-ciclodextrina –BCD, hidroxipropil-beta-ciclodextrina – HPBCD e metil-beta-ciclodextrina – RMBCD. As misturas foram umedecidas e submetidas a estresse térmico em câmara de estabilidade.

Método de preparação e análise das misturas:



7.3. Resultados e discussões

Os resultados das análises de DSC encontram-se compilados na Tabela 01 e no gráfico 01. Observa-se que os ITZ e BNZ apresentam picos de fusão bem definidos a 167,9 e 190,9°C. As misturas de ITZ-StMg, ITZ-MCC e ITZ-BCD não apresentaram qualquer sinal de interação térmica, desta forma podem ser considerados compatíveis e estas misturas são seguras quando empregadas em uma formulação.

Tabela 1: Resultados de calorimetria diferencial de varredura - DSC

Amostra ¹	T _{peak} (°C)	Intervalo (°C)	ΔH/J g ⁻¹	Interação Térmica ²	
ITZ	167,89	166-171	- 85,97	-	
BNZ	190,91	189-195	- 139,30	-	
ITZ + βCD	PM	168,12	165-171	- 43,20	0
	PH	167,87	164-171	- 42,24	0
	WM	167,05	163-170	- 40,40	+
ITZ + BNZ	PM	158,82	156-162	- 49,59	+++
	PH	157,42	153-161	- 46,03	+++
	WM	158,40	156-161	- 45,64	+++
ITZ + HPβCD	PM	168,31	165-171	- 42,44	0
	PH	167,78	164-171	- 33,06	+
	WM	167,31	164-171	- 39,84	+
ITZ + HPMC	PM	168,02	165-171	- 42,03	0
	PH	167,78	164-171	- 33,48	+
	WM	170,13	165-174	- 34,60	++
ITZ + MgSt	PM	167,58	165-171	- 40,27	0
	PH	167,49	165-171	- 45,04	0
	WM	167,45	165-170	- 42,88	0
ITZ + MCC	PM	167,81	165-171	- 40,61	0
	PH	167,80	165-171	- 40,55	0
	WM	167,52	165-171	- 40,93	0
ITZ + PVP	PM	167,97	165-171	- 40,08	0
	PH	167,26	164-170	- 39,20	0
	WM	163,54	153-167	- 37,82	+++
ITZ + RMβCD	PM	168,04	165-171	- 42,06	0
	PH	167,82	164-171	- 45,70	+
	WM	166,90	164-170	- 40,15	0

¹ (PM): mistura física; (PH): mistura fotoestabilidade; (WM): mistura umedecida

² (0): nenhuma; (+): menor; (++) média; (+++): forte

As misturas de ITZ com BNZ, PVP e HPMC apresentaram mudanças significativas nos seus parâmetros térmicos. A mistura ITZ-BNZ proporcionou um deslocamento da temperatura de fusão do ITZ de 10°C (158,8°C) e quando submetida a estresse luminoso passou a 157,4°C. A umidificação das amostras de ITZ-HPMC e ITZ-PVP pode ter favorecido a interação destes componentes, já que os pontos de fusão das misturas se modificaram apenas nas amostras umedecidas (170,1° e 163,5°C, respectivamente). Dessa forma, os estudos térmicos sugerem que PVP e HPMC devem ser evitados em formulações elaboradas com ITZ.

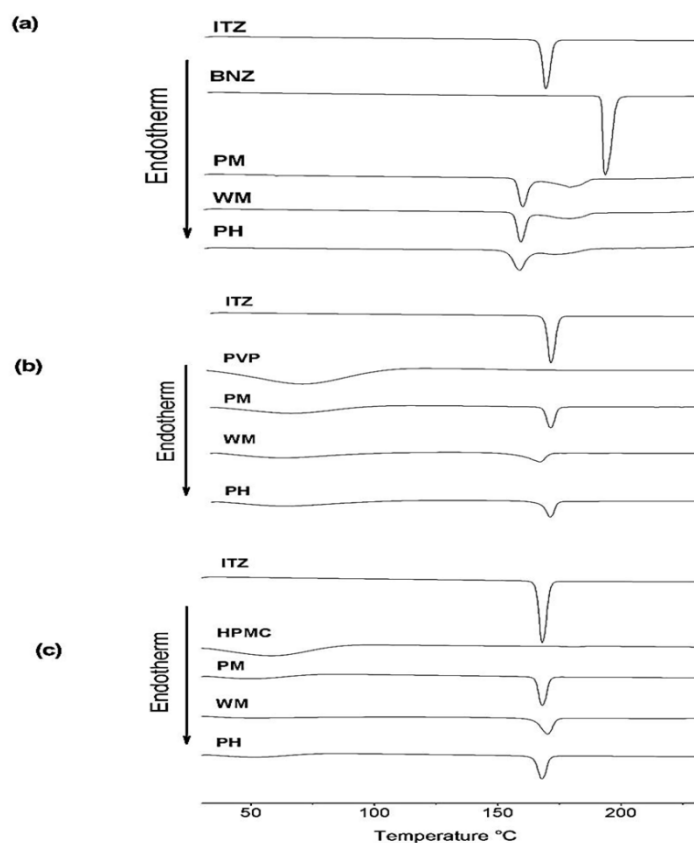


Gráfico 1: Curvas de DSC das misturas binárias de ITZ com BNZ (a), PVP (b) e HPMC (c) e suas respectivas misturas físicas (PM), misturas umedecidas (WM) e de fotoestabilidade (PH).

As misturas de ITZ com as ciclodextrinas substituídas RMBCD e HPBCD umedecidas apresentaram um pequeno deslocamento do pico de fusão do fármaco (166,9 e 167,3°C, respectivamente). Essas mudanças ocorreram devido à formação de complexos de inclusão do ITZ na cavidade dessas ciclodextrinas.

7.4. Conclusão

Pode-se concluir que a associação entre itraconazol e benznidazol apresenta riscos para a estabilidade da formulação. Sugere-se, portanto, evitar o processamento farmacêutico conjunto desses fármacos em uma forma farmacêutica dose fixa combinada.

8. CAPÍTULO 5

8. TERMOGRAVIMETRIA ISOTÉRMICA PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ITRACONAZOL E BENZNIDAZOL

8.1. Introdução

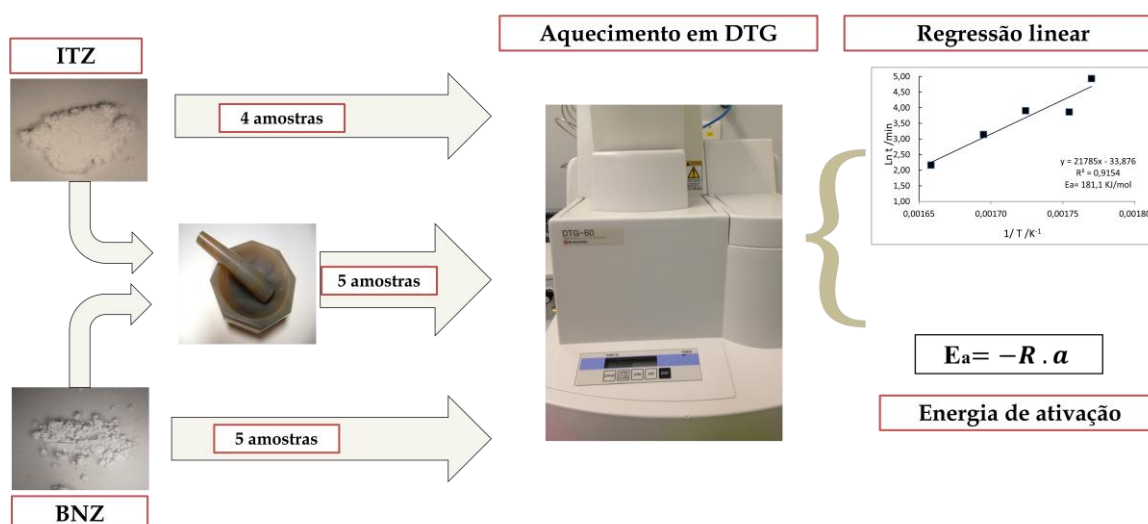
A doença de Chagas é uma doença incapacitante que afeta mais de 15 milhões de pessoas no mundo. Estudos recentes apontam que a associação de fármacos constitui uma das mais promissoras estratégias para seu tratamento, especialmente associações do fármaco tripanocida benznidazol (BNZ) com antifúngicos, como o itraconazol (ITZ).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a compatibilidade entre os fármacos ITZ e BNZ empregando termogravimetria derivada (DTG).

8.2. Metodologia

As amostras puras de ITZ e BNZ e misturas binárias equimassa foram aquecidas a 10°C/min até alcançar temperaturas próximas da degradação do fármaco. A seguir as temperaturas foram mantidas até que as amostras apresentassem decaimentos de 5% de seu peso, devido à degradação. Para cada amostra foram testadas pelo menos 5 temperaturas diferentes. A regressão linear dos resultados do experimento foi realizada plotando-se o logaritmo da razão do tempo de aquecimento versus o inverso da temperatura absoluta. A energia de ativação envolvida no processo de decomposição foi estimada a partir da equação de Arrhenius.

Método de preparação e análise das misturas:



8.3. Resultados e discussões

Os resultados das análises de DSC encontram-se compilados na Tabela 01 e nos Gráfico 01. O fármaco ITZ apresentou sua decomposição envolvendo uma energia de ativação de 206,4 KJ/mol a temperaturas superiores a 330°C. Os dados de regressão se ajustaram com um coeficiente de correlação linear de 0,9968.

O BNZ apresentou um processo degradativo que se inicia a 260°C, e envolve um valor de energia de ativação na ordem de 140,9 KJ/mol, com coeficiente de correlação linear igual a 0,9817. A associação desses compostos em uma mistura binária inicia sua degradação com o processo degradativo do BNZ, que ocorre antes da decomposição do ITZ. Na mistura de compostos, a reação de degradação do BNZ é antecipada e envolve uma energia de ativação de 124,2 KJ/mol ($R^2 = 0,9975$), mais de 10% inferior a apresentada pelo BNZ quando analisado sozinho.

Tabela 1: Dados de termogravimetria isométrica.

Amostra ¹	T (°C)	t 5% (s) ¹	Energia de ativação
ITZ	292	8315	181,1 KJ/mol
	307	2975	
	317	1390	
	330	522	
BNZ	188	7758	140,9 KJ/mol
	199	4199	
	210	1208	
	219	870	
	230	411	
ITZ +BNZ	190	7758	124,2 KJ/mol
	199	4199	
	210	1208	
	218	870	
	228	411	

¹ Tempo necessário para reduzir 5% do peso inicial da amostra

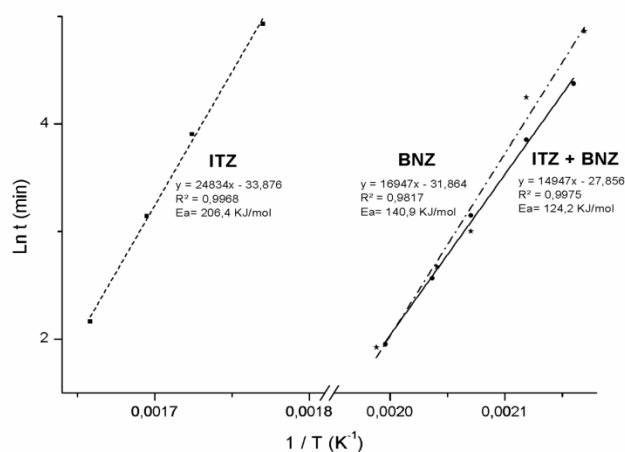


Gráfico 1: Regressões lineares do logaritmo do tempo pelo inverso da temperatura das substâncias puras ITZ, BNZ e da sua mistura física.

Esse resultado indica que na mistura BNZ-ITZ há um claro favorecimento do processo degradativo, sugerindo a existência de uma incompatibilidade entre esses componentes.

8.4. Conclusão

A partir desse estudo pode-se concluir que a coexistência dos fármacos BNZ e ITZ em uma mesma forma farmacêutica poderá comprometer sua estabilidade.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de compatibilidade conduzidos entre os fármacos BNZ e ITZ mostraram forte interação física com repercussões na estabilidade química desses compostos. Esse resultado condicionou o processamento farmacêutico utilizado na sequência do estudo, optando-se por elaborar péletes de cada um dos fármacos separadamente.

Os estudos de pré-formulação iniciais realizados evidenciaram a compatibilidade de ITZ com os excipientes MgST, ciclodextrinas, CMC e NaCrosco. Em contrapartida, as associações de ITZ com PVP e HPMC são incompatíveis e potencialmente instáveis. Já o BNZ mostrou-se compatível com os materiais MCC, NaCrosco, NaGlico e PEG, todos utilizados na elaboração de péletes.

Os péletes elaborados com microcristais de ITZ possuem características físico-químicas e farmacopeicas adequadas apresentando desintegração praticamente instantânea, devido ao elevado percentual de NaCrosco na formulação. Contudo, a performance de dissolução dos péletes elaborados com microcristais de ITZ ainda é inferior ao conseguido pela formulação comercial, o que evidencia a necessidade de aprimoramento desse sistema, especialmente nos minutos iniciais de dissolução.

As formulações de péletes de BNZ obtidos pela técnica de extrusão-esferonização utilizando microcristais do fármaco apresentaram características físico-químicas apropriadas, obtendo-se péletes de formato cilíndrico, com excelentes propriedades de fluxo e rápida desintegração e dissolução. O uso de NaCrosco e PEG demonstrou um bom desempenho em promover uma rápida desintegração dos péletes.

Dessa forma, o estudo desenvolvido obteve êxito em desenvolver sistemas multiparticulados de BNZ e ITZ que podem ser facilmente combinados em diferentes proporções, possibilitando estudos futuros em terapia dose fixa combinada para o tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.L.; MARTELLI, C.M.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, S.A.; AIRES, A.I.; SOUSSUMI, L.M.; COVAS, D.T.; SILVA, L.S.; ANDRADE, J.G.; TRAVASSOS, L.R.; ALMEIDA, I.C. Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. **Am.J.Trop Med.Hyg.** v. 71, p. 594-597, 2004.
- ALSARRA, I.A.; ALANAZI F.K.; AHMED, S.M.; BOSELA, A.A.; ALHAMED, S.S.; MOWAFY, H.A.; NEAU, S.H. Comparative study of itraconazole–cyclodextrin inclusion complex and its commercial product, **Arch. Pharm. Res.** v. 33, p. 1009–1017, 2010.
- ALTCLAS, J.; SINAGRA, A.; DICTAR, M.; LUNA, C.; VERÓN, M.T.; DE RISSIO, A. M.; GARCÍA, M. M.; SALGUEIRA, C.; RIARTE, A. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. **Bone mar. transplantation**, v.36, p.123-129, 2005.
- AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. **Editora Artimed.** 2ª Ed.; p. 124-128, 2005.
- APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.J.R.; JURI, D. Treatment of Chronic Chagas' Disease with Itraconazole and Allopurinol. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59(1), p. 133–138, 1998.
- APT W., ARRIBADA A., ZULANTAY I., RODRIGUEZ J., SAAVEDRA M., MUÑOZ A., Treatment of Chagas' disease with itraconazole: electrocardiographic and parasitological conditions after 20 years of follow-up, **J Antimicrob Chemother.** v. 68, p. 2164 –2169, 2013.
- BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v.362, n.9394, p.1469-1480, 2003.
- BENCHAWAN, C., PORNSAK, S., Novel disintegrating microcrystalline cellulose pellets with improved drug dissolution performance. **Powder Technology.** v. 233, p. 278–285, 2013.
- BERN C.; MONTGOMERY, S.P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 52–54, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Website: www.anvisa.gov.br/medicamentos. Acessado em 15 de julho de 2014.
- BURGOS J.M., ALTCHER J., PETRUCCELLI N., BISIO M., LEVIN M.J., FREILIJ H. & SCHIJMAN A.G. Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery. **Diagn.Microbiol.Infect.Dis.** v. 65, p. 58-61, 2009.

- CASTRO J.A.; DE MECCA M.M.; BARTEL L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum. Exp .Toxicol.** v. 25, p. 471-479, 2006.
- CEBALLOS L.A., CARDINAL M.V., VAZQUEZ-PROKOPEC G.M., LAURICELLA M.A., OROZCO M.M., CORTINAS R., SCHIJMAN A.G., LEVIN M.J., KITRON U.; GURTLER R.E. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. **Acta Trop.** v. 98, p. 286-296, 2006.
- CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening – role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Jour. Pharm. Biom. Anal.** v. 87, p. 82-97, 2014.
- CHEBOYINA, S.; CHAMBLISS, W.G.; WYANDT, C.M. A novel freeze pelletization technique for preparing matrix pellets. **Pharm Tech.** v. 28, p. 98-108, 2004a.
- CHEBOYINA, S.; CHAMBLISS, W.G.; WYANDT, C.M. Wax based sustained release matrix pellets prepared by a novel freeze pelletization technique I. Formulation and process variables affecting pellet characteristics. **Int J Pharm.** v. 359, p. 158-66, 2008.
- CHOKSHI R, ZIA HL. Hot melt extrusion technique: a review. **Iranian J Pharm.** v. 3, p. 3-16, 2004.
- CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; ROZAS, M.; APT, M.; SÁNCHEZ, G.; RODRÍGUEZ, J.; ORTIZ, S.; SOLARI, A. Dissimilar distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in humans alter chemotherapy with allopurinol and itraconazole. **J. Antimicrob.Chemother.** v. 58, p. 216–219, 2006.
- COURA, J.R.; ABREU, L.L.; WILCOX, H.P.F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.30, n.2, Mar./Apr. 1997.
- DANTAS, J. O.; CARVALHO, C.M.; VILAR, J.C. Chaves para identificação de vetores das principais zoonoses de Sergipe. II. Hemiptera. Siphonaptera. Basomatophora. **Biol. Ger. Experimental**, v.6, n.2, p.49-63, 2006.
- DE TORANZO E.G.; CASTRO J.A.; FRANKE DE CAZZULO B.M.; CAZZULO J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, p. 880-881, 1988.
- DEVICES GSI. **Pharmaceutical Pelletization Technology**. Marcel Dekker Inc.; v. 37, p. 30-100. 1989.

- DIAS, L.C.; DESSOY, M.A. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quim.Nova**, v 32(9), p. 2444-2457, 2009.
- DOCAMPO R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem.Biol.Interact**, v. 73, p. 1-27, 1990.
- DOCAMPO R. Mechanism of nifurtimox toxicity in different Forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, No. 14, p. 1947-1951, 1981.
- DUKIC-OTT, A.; REMON, J. P.; FOREMAN, P.; VERVAET, C. Immediate release of poorly soluble drugs from starch-based pellets prepared via extrusion/spheronisation, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 67, p. 715-724, 2007.
- FAUNDEZ, M.; PINO, L.; LETELIER, P.; ORTIZ, C.; LÓPEZ, R.; SEGUEL, C.; FERREIRA, J.; PAVANI, M.; MORELLO, A.; MAYA, J.D. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifur-timox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*, **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49, p. 126–130, 2005.
- FERNANDES C.D.; TIECHER F.M.; BALBINOT M.M.; LIARTE D.B.; SCHOLL D.; STEINDEL M.; ROMANHA A. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 27-32, 2009.
- FONSECA-BERZAL, C.; ESCARIO, J.A.; ARÁN, V.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Further insights into biological evaluation of new anti-*Trypanosoma cruzi* 5-nitroindazoles. **Parasitol Res**, v. 113, p.1049–1056, 2014.
- FRANCISCO, A. F.; DE ABREU VIEIRA, P. M.; ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. L.; MARTINS, H. R.; SILVA, M.; VELOSO, V. M.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. *Trypanosoma cruzi*: Effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. **Exp. Parasitol.** v. 120(4), p. 314-319. 2008.
- GOYANES, A., SOUTO, C., MARTÍNEZ-PACHECO, R. Control of drug release by incorporation of sorbitol or mannitol in microcrystalline-cellulose-base pellets prepared by extrusion-spheronisation, **Pharm. Dev. Technology**, v. 15(6), p. 636-635, 2010.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, p. 22–27, 2010.
- GUEDES, P.M.M., FIETTO, JLR; LANA, M. e BAHIA, M.T. Advances in Chagas Disease Chemotherapy. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 175-186, 2006.
- GUEDES, P.M.M. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. **Vet. Imm. Immunopathology**, v.130, p.43-52, 2009.

- GONZALEZ P.; MARIN C.; RODRIGUEZ-GONZALEZ I.; ILLANA A.; MATEO H.; LONGONI S.S.; ROSALES M.J.; GONZALEZ-COLOMA A.; REINA M. & SANCHEZ-MORENO M. Diterpenoid alkaloid derivatives as potential chemotherapeutic agents in American trypanosomiasis. **Pharmacology**, v. 76, p. 123-128, 2006.
- GOYANES, A., SOUTO, C., MARTÍNEZ-PACHECO, R. Control of drug release by incorporation of sorbitol or mannitol in microcrystalline-cellulose-base pallets prepared by extrusion-spheronisation, **Pharm. Dev. Technology**, v. 15(6), p. 636-635, 2010.
- HAMEDELNIEL, E.I.; BAJDIK, J.; PINTYE-HÓDI, K. Optimization of preparation of matrix pellets containing ethylcellulose. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 49, n. 1, p. 120-124, 2010.
- HEYKANTS, J.; VAN-PEER, A.; VAN-DE-VELDE, V.; VAN-ROOY, P., MEULDERMANS, W., LAVRIJSEN, K.; WOESTENBORGH, R.; VAN-CUTSEM, J.; CAUWENBERGH, G. The Clinical Pharmacokinetics of Itraconazole: An Overview. **Journ. Mycoses**. v. 32 (1), p. 67-87, 1989.
- HONORATO, S.A.; MENDONÇA, J.S.; BOECHAT, N.; OLIVEIRA, A.C.; MENDES-FILHO, J.; ELLENA, J.; AYALA, A.P.; Novel polymorphs of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benzimidazole. **Spectrochimica Acta A: Molec. Biom. Spectroscopy**, v. 118, p. 389-394, 2014.
- KANDUKURI, J.M.; ALLENKI, V.; EAGA, C.M.; KESHETTY, V.; JANNU, K.K. Pelletization Techniques for Oral Drug Delivery. **Intern. Journ. Pharm. Sci. Drug Res.** v. 1(2), p. 63-70, 2009.
- KUMAR, N.; GOINDI, S.; SAINI, B.; BANSAL, G.; Thermal characterization and compatibility studies of itraconazole and excipients for development of solid lipid nanoparticles. **J Therm Anal Calorim.** v. 87, p. 33-39, 2013.
- LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap.11, p.85-108.
- LANA M.; LOPES L.A.; MARTINS H.R.; BAHIA M.T.; HADO-DE-ASSIS G.F.; WENDLING A.P.; MARTINS-FILHO O.A.; MONTOYA R.A.; DIAS J.C.; BAJARVINAS P.; COURA J.R. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1139-1147, 2009.
- LIRA, A.M.; ARAÚJO, A.A.S.; BASÍLIO, I.D.J.; SANTOS, B.L.L.; SANTANA, D.P.; MACEDO, R.O. Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations, **Thermochim. Acta**. v. 457, p. 1-6, 2007.

- LUEHRING, T.A.F.M.; **Avaliação da terapia de combinação do Itraconazol e Benznidazol no tratamento da doença de Chagas experimental** (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, p 97, 2012.
- MARINESCU, D.; PINCU, E.; STANCULESCU, I.; MELTZER, V. Thermal and spectral characterization of a binary mixture (acyclovir and fluocinolone acetonide): eutectic reaction and inclusion complexes with β -cyclodextrin, **Thermochim. Acta**, v. 560, p. 104–111, 2013.
- MAXIMIANO, F.P.; PAULA, L.M.; FIGUEIREDO, V.P.; ANDRADE, I. M.; TALVANI, A.; SÁ-BARRETO, L.C.L.; BAHIA M.T.; CUNHA-FILHO, M.S. Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 78, p. 377-384, 2011a.
- MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.H.Y.; SÁ BARRETO, L.C.L.; BAHIA, M.T.; CUNHA-FILHO, M. Development of effervescent tablets containing benznidazole complexed with cyclodextrin. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 63, p. 786-793. 2011b.
- MILLILI, G.P.; SCHWARTZ J.B. The strength of microcrystalline cellulose pellets: the effect of granulating with water/ethanol mixtures. **Drug. Dev. Ind. Pharm.** v. 16(8), p. 1411–1426, 1990.
- MOLINA, I.; GÓMEZ, J.; PRAT, I.; SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO E.; SERRE, N.; POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **New Engl. Journ. Med.** v. 370 (2), p. 1899-1908, 2014.
- MOTT K.E.; Parasitic diseases and urban development. **Bulletin of the WHO**, v. 68, p. 691-698, 1990.
- NÓBREGA, A.A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerg. Infect. Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653-655, 2009.
- OVERHOFF, K.A.; ALEJANDRO MORENO, A.; MILLER, D.A.; KEITH P. JOHNSTON, K.P.; WILLIAMS III, R.O. Solid dispersions of itraconazole and enteric polymers made by ultra-rapid freezing. **Intern. Jour. Pharm.** v. 336, p. 122-132, 2007.
- PALMEIRO-ROLDAN, R.; FONSECA-BERZAL, C.; GOMEZ-BARRIO, A.; ARAN, J.V.; ESCARIO, A.J.; TORRADO-DURAN, S.; TORRADO-SANTIAGO, S. Characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **Int. Journ. Pharmaceutics**, v. 144, p. 1-9, 2014.
- PARK, Y.J.; XUAN, J.J.; OH, D.H.; BALAKRISHNAN, P.; YANG, H.J.; YEO, W.H.; LEE, M.K.; CHOI, H.G.; YONG, C.S. Development of novel itraconazole-

loaded solid dispersion without crystalline change with improved bioavailability. **Arch. Pharm. Res.** v. 33 (33), p. 1217-1225, 2010.

- PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. Ciências Farm.** V. 42, n. 4, 2007.
- PODCZECK, F.; NEWTON, J.M. Influence of the standing time of the extrudate and speed of rotation of the spheroniser plate on the properties of pellets produced by extrusion and spheronisation. **Adv. Pow. Technology**, v. 25, p. 659–665, 2014.
- PRATA A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect.Dis.** v. 1, p.92-100, 2001.
- RASSI JUNIOR, A.; MARIN-NETO J.A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, p. 1388–1402, 2010.
- RASENACK, N.; MULLER, B. W. Dissolution Rate Enhancement by *inSitu* Micronization of Poorly Water-Soluble Drugs, **Pharmaceutical Research**, v. 19 (12), p. 35-38, 2003.
- ROWE, C.R.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. Handbook of Pharmaceutical Excipients, **Pharmaceutical Press**, v.6, p. 888, 2009.
- SAHAH, R.B.; TAWQKKUL, M.A.; KHAN, M.A. Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules, **AAPS PharmaSciTech**, v. 9(1), p. 250-258, 2008.
- SANTOS, H.M.M.; VEIGA, F.J.B.; PINA, M.E.T.; SOUSA, J.J.M.S. Obtenção de pellets por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. **Rev. Bras. Cienc. Farm. Braz. J. Pharm. Sci**, v. 40, p. 4-15, 2004.
- SARKAR, S.; VALERIA, C. Moistening Liquid-Dependent De-aggregation of Microcrystalline Cellulose and Its Impact on Pellet Formation by Extrusion–Spheronisation. **AAPS PharmSciTech**. v. 85, p. 87-96, 2014.
- SATYAVATHI, K.; ANNAPURNA, K.V.S.S.; GAYATHRI, P.; BHOJARAJU, P.; KANTHAL, L.K.; VEERRAJU, T. Formulation and Evaluation of Immediate Release Tablets of Eprosartan Mesylate. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 25(1), p. 36-40, 2014.
- SCHRANK, S.; KANN, B.; WINDBERGS, M.; GLASSER, B.J.; ZIMMER, A.; KHINAST, J.; ROBLEGG, E. Microstructure of Calcium Stearate Matrix Pellets: A Function of the Drying Process. **Journ. Pharm. Science**. v. 90, p. 78-95.
- SCHMUNIS, G.A.; *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, p. 547-557, 1991.

- SCHMUNIS, G.A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, supl 1, p. 93-101, 1999.
- SINGH, A.V., NATH L.K. Evaluation of compatibility of tablet excipients and novelsynthesized polymer with lamivudine, **J. Thermal. Anal. Calorim.** v. 108 p. 263–267, 2012.
- SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E.L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. **Current Opinion in Infectious Disease**, v. 19, p. 583-587, 2006.
- SOUTO, C.; RODRÍGUEZ, A.; PARAJES, S.; PACHECO, R. A. Comparative study of the utility of two superdisintegrants in microcrystalline cellulose pellets prepared by extrusion-spheronisation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 61, p. 94-99, 2005.
- STOPPANI, A.O.P. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. **Medicina**, v. 59, p. 147-165, 1999.
- STRAUSS, M.; PRESTI, M.S.; BÁZAN, P.C.; BAEZ, A.; FAURO, R.; ESTEVEZ, B.; NEGRETE, O.S.; CREMONEZZI, D.; PAGLINI-OLIVA, P.A.; RIVAROLA, H.W. Clomipramine and benznida-zole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi*infection, **Parasitol. Int.** v. 62, p. 293–299, 2013.
- TOLEDO M.J.; BAHIA M.T.; CARNEIRO C.M.; MARTINS-FILHO O.A.; TIBAYRENC M.; BARNABE C.; TAFURI W.L.; DE, L.M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47, 223-230, 2003.
- TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, M.-C.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **Ame. Jour. Trop. Med. Hygiene**, v.70, n.2, p.201-209, 2004.
- URBINA J.A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 94 (1), p. 349-355, 1999.
- URBINA J.A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 311-318. 2009a.
- URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115(1), p. 55-68, 2009.
- VERMA, R.K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug–excipient compatibility testing. **Journ. Pharm. Biom. Anal.**, v. 38, p. 633–644, 2005.

- VERRECK, G.; SIX, K.; VAN-DEN-MOOTER, G.; BAERT, L.; PEETERS, J.; BREWSTER, M.E. Characterization of solid dispersion of itraconazole and hydroxypropylmethylcellulose prepared by melt extrusion – part 1. **Intern. Journ. Pharm.** v. 251, p. 165-174, 2002.
- VIVAS L.; RATTRAY L.; STEWART L.; BONGARD E.; ROBINSON B.L.; PETERS W.; CROFT S.L. Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination in vitro and in vivo. **Acta Trop**, v. 105, p. 222-228, 2008.
- VIOTTI, R.; NOYA, A.B.; ARAUJO-JORGE, T.; GRIJALVA, M.J.; GUHL, F.; LÓPEZ, M.C.; RAMSEY, J.M.; RIBEIRO, I., SCHIJMAN, A.G.; SOSA-ESTANI, S.; TORRICO, F.; GASCON, J.; Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas, **Disease Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58(2), p. 635, 2014.
- WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin.Microbiol.Rev.** v. 11, p. 382-402, 1998.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Tropical Disease (NTD) Research: Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis.** 2012. Available at: <<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/en/>>. Acessado em 26 de maio, 2014.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Chagas disease (American trypanosomiasis): keyfacts, 2013**, Available from: <http://www.who.int/>. Acessado em 06/07/2014.
- ZULANTAY, I.; APT, W.; RODRIGUEZ, J.; VENEGAS, J.; SANCHEZ, G. Serologic evaluation of treatment of chronic Chagas disease with allopurinol and itraconazole. **Rev. Med. Chil.** v. 126, p. 265-270, 1998.

Anexo 1:

Thermochimica Acta 575 (2014) 29–33



Contents lists available at ScienceDirect

Thermochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tca



Preformulation studies of itraconazole associated with benznidazole and pharmaceutical excipients



I. Alves-Silva^a, L.C.L. Sá-Barreto^b, E.M. Lima^c, M.S.S. Cunha-Filho^{d,*}

^a Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília (UnB), 70910-900 Brasília, DF, Brazil

^b Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900 Brasília, Brazil

^c Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos, Universidade Federal de Goiás (UFG), GO, Brazil

^d Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, CEP 70910-900 Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 July 2013
Received in revised form
22 October 2013

ABSTRACT

Recent studies have shown that the antifungal itraconazole (ITZ), when in associations with benznidazole (BNZ), is a potential treatment for Chagas disease. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the compatibility of ITZ with BNZ and with selected pharmaceutical excipi-