

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**SUZANA GONÇALVES CARVALHO**

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO FURAZOLIDONA:CICLODEXTRINAS VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CANINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO  
BIOLÓGICA *in vitro***

**ALEGRE-ES**

**2019**

SUZANA GONÇALVES CARVALHO

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO FURAZOLIDONA:CICLODEXTRINAS VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CANINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO  
BIOLÓGICA *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.: Janaína Cecília Oliveira Villanova.

Co-orientador: Prof. Dr.: Jair Carlos Checon de Freitas

ALEGRE-ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

C331c Carvalho, Suzana Gonçalves, 1994-  
Complexo de inclusão furazolidona:ciclodextrinas visando o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da Leishmaniose cutânea canina: Caracterização física e avaliação biológica in vitro / Suzana Gonçalves Carvalho. - 2019.  
90 f. : il.

Orientadora: Janaína Cecília Oliveira Villanova.  
Coorientador: Jair Carlos Checon Freitas.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Leishmaniose cutânea canina. 2. Furazolidona. 3. Ciclodextrinas. 4. Farmacotécnica veterinária. 5. nitrofuranos. 6. Atividade leishmanicida. I. Villanova, Janaína Cecília Oliveira. II. Freitas, Jair Carlos Checon. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

---

SUZANA GONÇALVES CARVALHO

**COMPLEXOS DE INCLUSÃO FURAZOLIDONA: CICLODEXTRINAS VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CANINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO  
BIOLÓGICA *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Cecilia Oliveira  
Villanova  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Prof. Dr. Jair Carlos Checon de Freitas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Aparecida Severi  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro Interno

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane dos Santos Giuberti  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro Externo

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que apesar das dificuldades encontradas me deu forças para que chegasse até aqui e que me fez aprender a não desistir dos meus sonhos.

À minha mãe, Penha Cristina Gonçalves Carvalho, minha avó Maria da Penha Gonçalves Carvalho e ao meu pai de consideração Rui Carneiro, por todo o incentivo de sempre e pela minha educação. A vocês devo tudo que sou.

À minha orientadora, amiga e mãe de coração Janaína, que me acolheu como orientada e que em todo o tempo de orientação me ensinou muito sobre a Farmacotécnica e sobre a vida. Meu agradecimento por você será eterno.

Ao meu co-orientador Jair Carlos Checon, por toda atenção, disponibilidade e aprendizado dispensados.

À mestre e amiga (madrinha também), Juliana Aparecida Severi que além de professora foi conselheira e que sempre me incentivou nas escolhas profissionais.

À minha família por todo apoio e carinho, por não medirem esforços para sempre estarem comigo e me ajudarem no que fosse preciso. Um agradecimento em especial a minha irmã Thaís Carvalho por toda paciência e por nunca ter medido esforços para me ajudar. Às minhas tias Maria José, Mônica e Regina e minha prima Letícia.

À minha família que não é de sangue, mas é família que Alegre me deu pelo coração, e que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis. Vocês serão minha saudade diária na minha nova caminhada. Muito obrigada Daniela, Edilson, Gabriel, João Antônio, Natan, Patrícia, Rhuany, Sarah e Thiago.

Aos meus amigos, alunos e companheiros do LPF por todo incentivo de sempre. Sou muito grata a vocês.

À Universidade Federal do Espírito Santo que foi a minha segunda casa dos últimos anos, proporcionando todas as ferramentas para a construção da minha formação acadêmica e da minha pós-graduação em Ciências Veterinárias.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

“O que nos faz ser grandes é não perder o futuro de vista. O que nos movimenta é à vontade, o desejo e, também a angústia de querer ser. É chegar a um ponto, fincar a bandeira da conquista e, nesse instante, começar a buscar outros portos”

Autor Desconhecido

## RESUMO

CARVALHO, SUZANA GONÇALVES. **COMPLEXOS DE INCLUSÃO FURAZOLIDONA:CICLODEXTRINAS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CANINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro***. 2019. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências / e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

A leishmaniose cutânea é uma doença zoonose, sendo causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose cutânea canina (LCC) é considerada uma antropozoonose e, atualmente não existe farmacoterapia disponível, no Brasil, para o seu tratamento. Assim, a busca por alternativas farmacêuticas para uso nos animais tem sido objeto de inúmeras pesquisas. Neste cenário, a atividade leishmanicida da furazolidona vem sendo estudada por diversos pesquisadores e, uma vez que o fármaco não é utilizado no tratamento das leishmanioses no homem, seu uso para o tratamento da LCC pode ser considerado. Relatos científicos apontam a furazolidona como um quimioterápico com boa atividade leishmanicida. Contudo, problemas de toxicidade animal também são relatados, o que pode estar relacionado a sua baixa solubilidade e altas doses requeridas para que o efeito terapêutico seja alcançado. Entre as inúmeras alternativas farmacotécnicas disponíveis para contornar problemas de solubilidade, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas merece destaque. Além de melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade das moléculas hóspedes, a formação de complexos de inclusão (CIs) pode aumentar a estabilidade e favorecer o mascaramento do sabor dos fármacos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi preparar CIs entre a furazolidona (FZD) e duas ciclodextrinas de interesse farmacêutico: a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD). Os CIs foram preparados nas razões molares 1:1 e 1:2 (FZD:CD) pelos métodos de malaxagem e liofilização. A presença de amorfização das partículas e o sucesso da complexação foram confirmadas empregando técnicas de caracterização física e química, a saber: calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG/DTG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido. Após a caracterização físico-química, avaliou-se a atividade leishmanicida

utilizando o método calorimétrico de redução da resazurina em formas promastigotas. A citotoxicidade foi avaliada sobre macrófagos provenientes de monócitos THP-1, empregando-se o ensaio calorimétrico com MTT. Os processos de malaxagem e liofilização escolhidos para a obtenção dos complexos, se mostraram simples e de fácil execução, passíveis de serem escalonadas. A presença de amorfização e a indicação de complexação para os produtos obtidos a partir da  $\beta$ -CD e da HP- $\beta$ -CD, na razão molar 1:2, preparadas por liofilização, foi confirmada por todas as técnicas utilizadas. Em todos os demais produtos, foi constatada a ocorrência de interações entre o fármaco e as ciclodextrinas em estudo, indicando a formação de agregados do tipo não-complexo. Todas as amostras apresentaram atividade leishmanicida e se mostraram não tóxicas para macrófagos THP-1. Os valores do IC<sub>50</sub> para os produtos de complexação MHFZD1:2 e LHFZD1:2 foram 2,7 e 3,02  $\mu$ g/mL, respectivamente, sendo ambos considerados promissores para o desenvolvimento de medicamentos de uso veterinário com vistas ao uso no tratamento de leishmanioses em cães.

Palavras-chave:  $\beta$ -ciclodextrina; hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; atividade leishmanicida; nitrofuranos.



## ABSTRACT

CARVALHO, SUZANA GONÇALVES. **INCLUSION COMPLEXES FURAZOLIDONE:CYCLODEXTRINS FOR THE DEVELOPMENT OF MEDICINES FOR THE TREATMENT OF CANINE CUTANEOUS LEISHMANIOSIS: PHYSICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL EVALUATION *in vitro***. 2019. 89p. Thesis (Master's Degree in Veterinary Science) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

Cutaneous leishmaniasis is an infectious disease that affects animals and humans, being caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Canine cutaneous leishmaniasis (CCL) is considered an anthroponosis and, currently, there is no pharmacotherapy available in Brazil for its treatment. Thus, the search for pharmaceutical alternatives for use in animals has been subject of numerous researches. In this sense, the leishmanicidal activity of furazolidone has been studied by several authors and, since the drug is not used in the treatment of human leishmaniasis, its use for the treatment of CCL can be considered. Reports in literature point to furazolidone as a chemotherapeutic with good leishmanicidal activity. However, animal toxicity problems are also reported, which may be related to their low solubility and high doses required for the therapeutic effect to be achieved. Among the numerous pharmacotechnical alternatives available to overcome solubility problems, the formation of inclusion complexes with cyclodextrins deserves attention. In addition to improving the solubility and bioavailability of the guest molecules, the formation of inclusion complexes (ICs) may increase stability and favor the masking of the flavor of the drugs. In this context, the objective of the present work was to prepare ICs between furazolidone (FZD) and two cyclodextrins of pharmaceutical interest:  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) and hydroxy-propyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD). The ICs were prepared in 1: 1 and 1: 2 molar ratios (FZD: CD) by the malaxation and lyophilization methods. The presence of amorphization of the particles and the success of the complexation were confirmed using complementary techniques, namely differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG / DTG), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) Raman spectroscopy and solid state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR). Following the physical-chemical characterization, 50% growth inhibition of the promastigote forms by the resazurin method and the cytotoxicity on THP-1

macrophages by the MTT method in the 72-hour period were investigated. The malaxation and lyophilization processes chosen to obtain the complexes were shown to be simple and easy to perform, and could be used both in laboratory and industrial scale. The presence of amorphization and the indication of complexation for the products obtained from  $\beta$ -CD and HP- $\beta$ -CD, in the molar ratio 1: 2, prepared by lyophilization, was confirmed by all the techniques used. In all other products, interactions between the drug and the cyclodextrins were observed, indicating the formation of non-complex type aggregates. All samples showed leishmanicidal activity and were non-toxic to THP-1 macrophages. The IC 50 values for the complexing products MHFZD1: 2 and LHFZD1: 2 were 2.7 and 3.02  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively, both being considered promising for the development of veterinary drugs for the use in the treatment of leiomyoses in dogs.

Keywords:  $\beta$ -cyclodextrin; hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; leishmanicidal activity.

## LISTA DE SIGLAS E/ OU ABREVIATURAS

CC <sub>50</sub>	Concentração de citotoxicidade de 50%
CD	Ciclodextrina
CGTase	Amilase ciclodextrina glicosil transferase
CIs	Complexos de inclusão
CP	<i>Cross polarization</i>
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Termogravimetria diferencial
FZD	Furazolidona
FZD:HP $\beta$ CD	Complexos de inclusão furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
FZD: $\beta$ -CD	Complexos de inclusão furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina
HP- $\beta$ -CD	2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
IC <sub>50</sub>	Inibição de 50% do crescimento do parasita
LBFZD1:1	Liofilização furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina 1:1
LBFZD1:2	Liofilização furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina 1:2
LCC	Leishmaniose cutânea canina
LHFZD1:1	Liofilização furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 1:1
LHFZD1:2	Liofilização furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 1:2
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MAS	<i>Magic-angle spinning</i>
MBFZD1:1	Malaxagem furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina 1:1
MBFZD1:2	Malaxagem furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina 1:2
MF	Mistura física
MFBFZD1:1	Mistura física furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina 1:1
MFBFZD1:2	Mistura física furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina 1:2
MFHFZD1:1	Mistura física furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 1:1
MFHFZD1:2	Mistura física furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 1:2
MFHP $\beta$ CD	Misturas físicas a partir da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
MF $\beta$ -CD	Misturas físicas a partir da $\beta$ -ciclodextrina

MHFZD1:1	Malaxagem furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 1:1
MHFZD1:2	Malaxagem furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 1:1
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difenil-2H-tetrazólico
OPAS/OMS	Organização Pan-Americana de Saúde/ Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutico
T	Temperatura
t	Tempo
TG	Termogravimetria
THP-1	Linhagem de macrófagos
$\beta$ -CD	$\beta$ -Ciclodextrina

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1-	Estrutura química da furazolidona.....	23
Figura 2-	Representação esquemática da formação de complexos fármaco:CD nas razões molares 1:1 e 1:2.....	28
Figura 3-	Estrutura molecular da $\beta$ -ciclodextrina.....	29
Figura 4-	Estrutura molecular da 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	32
<b>Capítulo 1</b>		
Figura 1	Estrutura química das CDs utilizadas no presente estudo.....	52
Figura 2	Curvas DSC em atmosfera de argônio (50 mL/min; 10 °C/min), obtidas entre 25 e 300 °C para as amostras preparadas a partir da $\beta$ -CD: (a) misturas físicas; (b) complexos obtidos por malaxagem; e, (c) complexos preparados por liofilização.....	61
Figura 3	Curvas DSC em atmosfera de argônio (50 mL/min; 10 °C/min), obtidas entre 25 e 300 °C para as amostras preparadas a partir da HP- $\beta$ -CD: (a) misturas físicas; (b) complexos obtidos por malaxagem; e, (c) complexos preparados por liofilização.....	62
Figura 4	Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de N <sub>2</sub> (50 mL min <sup>-1</sup> ; 10 °C/min), entre 25 e 800 °C, das amostras FZD, $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD.....	64
Figura 5	Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de N <sub>2</sub> (50 mL min <sup>-1</sup> ; 10 °C/min), entre 25 e 800 °C, das amostras preparadas a partir da $\beta$ -CD.....	65
Figura 6	Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de N <sub>2</sub> (50 mL min <sup>-1</sup> ; 10 °C/min), entre 25 e 800 °C, das amostras de complexos FZD:HP- $\beta$ -CD.....	66
Figura 7	Fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) e difratogramas de raios-X dos materiais de partida.....	69
Figura 8	Fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) e difratogramas de raios-X dos das misturas físicas.....	70
Figura 9	Fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) e difratogramas de raios-X dos das misturas físicas.....	71

Figura 10	Fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) e difratogramas de raios-X dos das misturas físicas.....	71
Figura 11	Espectro Raman dos materiais de partida e das misturas físicas..	73
Figura 12	Espectro Raman dos produtos FZD:β-CD preparados por (a) malaxagem e (b) liofilização.....	73
Figura 13	Espectro Raman dos produtos FZD:HP-β-CD preparados por (a) malaxagem e (b) liofilização.....	73
Figura 14	Espectros de RMN <sup>13</sup> C no estado sólido obtidos para a β-CD, HP-β-CD e da FZD.....	76
Figura 15	Espectros de RMN <sup>13</sup> C no estado sólido obtidos para os produtos baseados na β-CD: (a) faixa de 0 a 200 ppm e (b) ampliação da região entre 60 e 90 ppm.....	76
Figura 16	Espectros de RMN <sup>13</sup> C no estado sólido obtidos para os produtos baseados na HP-β-CD: (a) faixa de 0 a 200 ppm e (b) ampliação da região entre 60 e 80 ppm.....	77

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1- Variação de entalpia ( $\Delta H$ ), temperatura inicial ( $T_{on}$ ), temperatura final ( $T_{end}$ ) e temperatura máxima ( $T_{peak}$ ) de ocorrência dos eventos térmicos observados por DSC, em atmosfera de argônio (50 mL/min) e aquecimento de 10 °C/ min a 280 °C.....	63
Tabela 2- Perda de peso (%) relativas às CDs, misturas físicas e complexos obtidas por termogravimetria. Temperaturas aproximadas de eventos são mostradas entre parênteses.....	67
Tabela 3- Atividade biológica das amostras de ciclodextrinas ( $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina), furazolidona, misturas físicas e complexos contra a <i>L. amazonensis</i> em sua forma promastigota e avaliação citotóxica sobre a linhagem celular THP-1, após 72 horas.....	80

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
Quadro 1- Medicamentos disponíveis no mercado nacional e internacional preparados a partir de fármacos complexados com a $\beta$ -CD.....	31
Quadro 2- Medicamentos disponíveis no mercado nacional e internacional preparados a partir de fármacos complexados com a HP $\beta$ CD.....	33
Quadro 3- Técnicas utilizadas na caracterização de complexos de inclusão.....	34



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Leishmaniose cutânea canina .....	21
2.2 Furazolidona.....	22
2.3 Complexos de inclusão com ciclodextrinas .....	25
2.3.1 $\beta$ -ciclodextrina .....	28
2.3.2 Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina .....	31
2.3.3 Métodos de preparo e caracterização de complexos de inclusão .....	33
REFERÊNCIAS .....	39
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	47
Estudo da formação de complexos de furazolidona baseados em ciclodextrinas por análises térmicas, MEV, DRX, espectroscopia Raman e RMN de $^{13}\text{C}$ no estado sólido e, avaliação biológica <i>in vitro</i> .....	47
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	53
2.1 Material.....	53
2.2 Obtenção dos complexos .....	54
2.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	54
2.4 Análises térmicas.....	55
2.5 Difração de raios X.....	55
2.6 Espectroscopia Raman .....	55
2.6 RMN de $^{13}\text{C}$ no estado sólido .....	55
2.7 Avaliação biológica <i>in vitro</i> .....	56
2.7.1 Atividade leishmanicida.....	57
2.7.2 Diferenciação de células THP-1.....	57
2.7.3 Ensaio de citotoxicidade.....	58
3 Resultados e discussão .....	59
3.1 Preparo dos complexos .....	59
3.2 Caracterização dos complexos.....	60
3.2.1 Análises térmicas .....	60
3.2.2 Difração de raios X.....	68
3.2.3 Espectroscopia Raman .....	72
3.2.4 RMN de $^{13}\text{C}$ no estado sólido .....	74

3.2.5 Análise conjunta dos dados de caracterização .....	78
3.2.6 Atividade leishmanicida e citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	79
4 Conclusões .....	83

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária que se constitui como uma antropozoonose e que acomete, além do homem, animais silvestres e domésticos. As diferentes formas da doença são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que são transmitidos aos hospedeiros mediante repasto das fêmeas do mosquito palha (flebotomíneos, sub-família *Phlebotominae*) (SASANI et al., 2016). O espectro das formas clínicas pode variar em leishmaniose visceral, leishmaniose muco-cutânea e leishmaniose cutânea (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A forma cutânea da leishmaniose em cães, denominada leishmaniose cutânea canina (LCC) ou leishmaniose tegumentar americana (LTA), é considerada um grave problema de saúde pública no Brasil, e está disseminada em todo o país (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O Brasil possui as mais elevadas taxas de notificação da LCC entre os países da América do Sul, sendo que diferentes espécies de parasitos foram relacionadas à doença, nas quais se destacam: *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*, *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* e *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* (BRASIL, 2010; HEUSSER JÚNIOR et al., 2010; LAURENTI, 2010). No estado do Espírito Santo, os casos descritos de LCC devem-se, principalmente, à achados de *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* nos diagnósticos parasitológicos da doença (FALQUETO et al., 2003; PINTO et al., 2009).

A LCC, assim como as demais formas de leishmaniose, é considerada uma doença negligenciada, principalmente, porque a maioria dos casos ocorre longe dos serviços veterinários e, em decorrência da escassez de fármacos e novas formas farmacêuticas para uso exclusivo na farmacoterapia veterinária, uma vez que estes são considerados de baixo retorno financeiro para os laboratórios farmacêuticos (PASSOS et al., 2014; SASANI et al., 2016; SINGH et al., 2010). No Brasil, a farmacoterapia da leishmaniose tegumentar canina é insatisfatória e muitos desafios precisam ser superados, incluindo o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e a disponibilização de medicamentos com baixo custo para distribuição por programas de saúde pública. Neste contexto, a busca por novos fármacos e alternativas farmacêuticas capazes de suprirem esta lacuna, é objeto de diversas pesquisas. Relatos da literatura sugerem que a furazolidona apresenta potencial

terapêutico para o uso como leishmanicida (BERMAN; LEE, 1983; NEAL et al., 1988; REIMÃO; TANIWAKI; TEMPONE et al., 2010; TEMPONE; MORTARA; REIMÃO, 2010). Passos e colaboradores (2014) trataram cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* com uma associação entre furazolidona e domperidona e observaram que a terapêutica foi efetiva para o tratamento das lesões. No entanto, os autores observaram que a administração de FZD pode causar reações adversas nos cães, especialmente em casos de tratamentos por períodos prolongados, sendo que os animais podem apresentar perda de peso, fadiga e episódios de incoordenação motora. Toxicidade cardíaca, hepática e nefrótica também foram observadas (HUNDER; SCHMID; MAYRING, 1987). Uma vez que a FZD é rapidamente absorvida e metabolizada após administração oral, o emprego de altas doses com vistas à obtenção do efeito farmacológico pretendido é requerido, o que pode ser responsável pelos efeitos adversos observados, limitando o uso do fármaco (ALAM; PAGET; ELKORDY, 2016).

O aumento da solubilidade dos fármacos pode melhorar sua dissolução e biodisponibilidade, o que pode resultar na administração de doses mais baixas, contribuindo para a diminuição da toxicidade relacionada aos mesmos (LOBENBERG; AMIDON, 2000). Ainda, deve-se considerar que a baixa solubilidade aquosa dos fármacos se constitui como um grande problema a ser contornado pelos formuladores que trabalham com o desenvolvimento de formas farmacêuticas para uso oral (AHMED; KASRAIAN, 2002; CHAUDHARY et al., 2012; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012). A possibilidade de melhorar a solubilidade da FZD pode impactar, também, na redução da dose a ser administrada, o que permite contornar os problemas de toxicidade dose-dependente relacionadas ao seu uso, justificando o interesse no presente estudo. Ainda, é frequentemente relatado na literatura que substâncias lipofílicas tendem a apresentar maior citotoxicidade quando comparadas aos compostos hidrofílicos devido à maior permeabilidade dessas moléculas nas membranas celulares e que a complexação com ciclodextrinas pode reduzir a toxicidade aumentando a solubilidade do fármaco (CORRÊA et al., 2005; LYRA et al., 2012).

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos capazes de formarem complexos de inclusão com inúmeros fármacos, com objetivos diversos, entre eles, aumentar a solubilidade, melhorar a biodisponibilidade e incrementar a estabilidade (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; CHEIRSILP; RAKMAI, 2016; LOFTSSON et al.,

2005). Outra vantagem da preparação de complexos de inclusão é a possibilidade de mascarar o sabor desagradável e o odor de certos fármacos, o que também justifica seu uso no presente trabalho (MIRAJKAR et al., 2012; ZHENG et al., 2018). Uma diversidade de métodos pode ser empregada no preparo de complexos de inclusão, devendo os mesmos serem escolhidos de acordo com as características físico-químicas do fármaco e o tipo de ciclodextrina escolhida. Dentre estes, cabe destacar a malaxagem e a liofilização (CHEIRSILP, RAKMAI, 2016). Após a complexação, técnicas diversas e complementares devem ser empregadas para avaliar o sucesso da formação dos complexos (SINGH et al., 2010; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012a; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012b; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012c).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi aprimorar a solubilidade da FZD por meio da formação de complexos de inclusão entre o fármaco e ciclodextrinas de interesse farmacêutico, com vistas a aumentar sua solubilidade, melhorar a biodisponibilidade, possibilitando a redução da dose a ser administrada, com consequente redução da toxicidade. Além disso, o aumento da solubilidade visa favorecer a preparação de formas farmacêuticas orais líquidas, o que pode melhorar a adesão dos animais ao tratamento. Assim, nesse trabalho foram preparados complexos empregando a  $\beta$ -ciclodextrina e a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, nas razões molares 1:1 e 1:2, utilizando os métodos de malaxagem e liofilização. O sucesso da complexação foi avaliado mediante a análise dos compostos formados por calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, difração de raios X, espectroscopia RAMAN e ressonância magnética nuclear de carbono no estado sólido. Finalmente, a citotoxicidade dos compostos em linhagens de células THP-1 e a atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foram pesquisadas empregando métodos *in vitro*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmaniose cutânea canina

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por parasitos do gênero *Leishmania*, pertencentes ao subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), que acomete seres humanos e animais, considerada uma zoonose. Os parasitos causadores da leishmaniose vivem, alternadamente, em hospedeiros vertebrados e flebotomíneos (sub-família *Phlebotominae*), sendo estes últimos os responsáveis pela transmissão da doença (GRADONI, 1999; ALVAR et al., 2012).

Todas as espécies conhecidas são transmitidas por meio de repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de flebotomíneos que, ao realizarem o repasto no animal parasitado, podem sugar formas amastigotas. Estas, por sua vez, no interior do tubo digestório, diferenciam-se em formas promastigotas, multiplicando-se. As formas promastigotas migram para as partes anteriores do tubo digestório dos flebotomíneos e são inoculadas em um novo animal. Nos hospedeiros definitivos, os parasitos assumem a forma amastigota, multiplicando-se em células do sistema monocítico fagocitário (SMF). À medida em que se multiplicam, rompem os macrófagos e liberam parasitos que são fagocitados por outros macrófagos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

As formas clínicas da leishmaniose são a visceral, muco-cutânea e cutânea, também conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA). De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS), em 2016, o Brasil foi o país da América do Sul com maior número de casos de leishmaniose em humanos (12.690 novos casos), sendo 94% desses identificados como sendo da forma cutânea (OPAS/MS, 2016).

As formas de leishmaniose que podem acometer os cães são: visceral e cutânea. A forma sintomática da leishmaniose cutânea canina (LCC) acomete a pele e mucosas dos animais, apresentando como principais sintomas, lesões cutâneas ulceradas na bolsa escrotal, orelhas, membros e focinho. As principais espécies relacionadas à forma cutânea nos cães, no Brasil, são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; PINTO et al., 2009).

No que diz respeito ao controle da LCC, uma das principais formas recomendadas, além do uso de inseticidas para afastar o vetor, é evitar que os flebotomíneos realizem o repasto sanguíneo nos cães, mediante a utilização de coleiras contendo inseticidas, uso de xampus ou o emprego de produtos contendo agentes químicos eficazes. A manutenção da limpeza do habitat do animal, com a retirada de material orgânico como folhas, fezes e lixo, onde o flebotomíneo possa se reproduzir, também é de fundamental importância. Porém, cabe ressaltar que o vetor nem sempre é restrito às áreas domiciliares (GONTIJO et al., 2011).

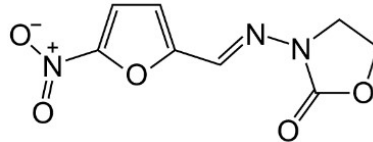
Do ponto de vista farmacológico, não existem medicamentos indicados para o tratamento da LCC no Brasil, uma vez que, segundo a legislação brasileira, medicamentos contendo fármacos destinados ao tratamento das leishmanioses em humanos não podem ser administrados nos animais, tendo em vista a possibilidade de causar resistência e inefetividade. A mesma Portaria Interministerial proibiu, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose em cães infectados ou doentes, com produtos não-registrados no MAPA (Brasil, 2008).

Tendo em vista a importância da LCC e das dificuldades envolvidas com o tratamento dos animais, a busca contínua por fármacos e formas farmacêuticas alternativas, faz-se necessária. De acordo com Kon e Rai (2015) o uso de fármacos não aprovados para o tratamento da leishmaniose, tais como, a furazolidona, a buparvaquona e o bisnaftal-imidopropil-diamino-octano vem sendo proposto e os mesmos apresentaram eficácia anti-leishmania aumentada depois de incorporados em formas farmacêuticas micro e nanoparticuladas (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Uma vez que a furazolidona não é utilizada em humanos para o tratamento das leishmanioses e que existem relatos do emprego do fármaco visando ação leishmanicida, o mesmo foi eleito como objeto de estudo para o presente trabalho.

## **2.2 Furazolidona**

A furazolidona (FZD) é um derivado sintético de um grupo de compostos denominados nitrofuranos, caracterizada pela presença do anel furânico em sua estrutura química, na qual existe um grupo nitro ligado (Figura 1) (GASHEVA et al., 1984). A FZD se caracteriza como um pó amarelo, cristalino, inodoro e com sabor amargo. Sua solubilidade em água é limitada, sendo considerado muito pouco solúvel em água (40 mg/L) e álcool, ligeiramente solúvel em dimetilsulfóxido e clorofórmio,

insolúvel em éter e, solúvel em ácido fórmico. O pH varia entre 4,5 a 7 em solução e o ponto de fusão é de 275 °C. O fármaco é fotossensível, ou seja, pode sofrer degradação sob ação da luz, devendo ser armazenado ao abrigo desta (SWEETMAN, 2009; USP, 2011).



**Figura 1.** Estrutura química da furazolidona

FONTE: Arquivo pessoal.

Na terapêutica veterinária, a FZD é indicada como endoparasiticida para uso no tratamento da giardíase, tricomoníase e histomoníase, em cães e gatos, na dose usual de 4 mg/kg não sendo, contudo, o fármaco de primeira escolha. Apesar do mecanismo da FZD não ter sido totalmente elucidado, a ação do fármaco sobre os parasitos parece estar relacionada à inibição de reações oxidativas, incluindo a descarboxilação do piruvato à acetil coenzima A, com redução do fornecimento de energia para as células. A redução do grupo nitro com formação de 3-amino-2-oxazolidinona e  $\beta$ -hidroxiethylhidrazina, principalmente, e dióxido de carbono e etileno também parecem estar associados à ação da FZD, uma vez que estes metabólitos reativos se ligam ao DNA dos parasitos, danificando-os e bloqueando a replicação e transcrição gênica (DE ANGELIS et al., 1999; HUNDER; SCHMID; MAYRING, 1987).

A furazolidona é bem absorvida no intestino de suínos e humanos, sendo rapidamente e extensivamente metabolizada, com concentração máxima alcançada em três horas e meia-vida de eliminação de cinco horas, determinadas em humanos e suínos. O fármaco é amplamente distribuído e extensivamente metabolizado, com excreção predominante na urina, com pequena quantidade do fármaco encontrado na forma inalterada (MADDISON, 2010). A eliminação do fármaco ocorre após metabolização por associação com a glutathione. O principal problema associado ao seu uso em animais é a toxicidade renal, cardíaca e hepática relatadas, acompanhadas ou não de irritação, perda de peso e fadiga, sendo a toxicidade dose-dependente (ALAM; PAGET; ELKORDY, 2016). A presença dos metabólitos responsáveis pelo efeito farmacológico parece estar associada à toxicidade do



fármaco. Carcinotoxicidade e genotoxicidade também são relatadas (BOSQUESI, 2008).

De acordo com dados da literatura, a biodisponibilidade da FZD varia de 40 a 87%, conforme a via de administração (DE ANGELIS et al., 1999; HUNDER; SCHMID; MAYRING, 1987). Estudos realizados em suínos e ratos, indicam que o fármaco é rapidamente metabolizado e eliminado, permanecendo por um curto período de tempo na corrente circulatória, o que requer o uso de doses elevadas (ALAM; PAGET; ELKORDY, 2016).

O uso da FZD tem sido proposto para diferentes finalidades terapêuticas. Jiang e colaboradores (2013) avaliaram a ação do fármaco sobre linhagens de células LMA e observaram que o fármaco apresentou propriedade antiproliferativa potente em concentrações submicromolares, induzindo apoptose e morte das células, sugerindo a existência de atividade do fármaco contra a leucemia mieloide aguda. Eisig e colaboradores (2005) avaliaram o sucesso de um tratamento de pacientes re-infectados por *Helicobacter pylori* partir de uma associação de quatro fármacos. Observaram que o uso da FZD na concentração de 400 mg diários foi bem tolerado e eficaz, sendo o fármaco uma boa opção de re-tratamento da infecção pelo *H. pylori*. Alam, Paget e Elkordy (2016) prepararam sistemas de liberação de furazolidona baseados em lipossomas com vistas ao uso no tratamento da infecção por *H. pylori*, cuja eficiência de encapsulação, liberação do fármaco e capacidade mucoadesiva foram afetadas pelo pH.

Inúmeros estudos encontrados na literatura evidenciam que a FZD também possui ação leishmanicida. Berman e Lee (1983) testaram a atividade leishmanicida de diferentes agentes antimicrobianos, dentre os quais, a furazolidona, sobre cepas de *L. tropica*. Os autores observaram que o fármaco foi capaz de eliminar 92% dos parasitos quando testado na concentração de 1,0 µg/mL. Neal, Bueren e Hooper (1998), avaliaram a atividade leishmanicida da furazolidona e da nitrofurazona mediante a realização de testes *in vitro* e *in vivo*. Observaram que a FZD apresentou atividade superior à da nitrofurazona contra as formas amastigotas de *Leishmania donovani*. Reimão, Taniwaki e Tempone (2010), avaliaram a atividade leishmanicida da FZD contra as formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*, que foram suscetíveis à droga livre, com valores de IC<sub>50</sub> variando de 0,47 µg/mL a 0,73 µg/mL. Tempone, Mortara e Reimão (2010) administraram FZD em sua forma lipossômica e livre a hamsters infectados com *L. (Leishmania) chagasi* e

observaram que a FZD lipossomal foi aproximadamente 100 vezes mais ativa e efetiva que o fármaco livre em matar as formas amastigotas dos parasitas. Passos e colaboradores (2014) trataram cães infectados com *L. (Viannia) braziliensis* juntamente com FZD e domperidona, e observaram que a terapia foi eficaz para o tratamento de LCC. Encorajados por estes resultados, nosso grupo de pesquisa preparou complexos furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina (FZD: $\beta$ -CD) que apresentaram atividade leishmanicida significativa contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, com valores IC<sub>50</sub> de 6,16  $\mu$ g/mL e 1,83  $\mu$ g/mL para os complexos preparados por malaxagem e liofilização, respectivamente, obtidos na proporção de massa 1:2. Os dados obtidos mostraram também que os complexos não apresentaram toxicidade para a linhagem de macrófagos testadas (CARVALHO et al., 2018).

A furazolidona teve seu uso proibido no Brasil em animais destinados à produção de alimentos, pela Portaria nº 448 de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1998).

### 2.3 Complexos de inclusão com ciclodextrinas

O sistema de classificação biofarmacêutico (SCB) é um sistema de classificação científica dos fármacos baseado no conhecimento da solubilidade e permeabilidade intestinal das moléculas. Quando informações do SCB são correlacionadas à dados acerca da dissolução dos fármacos *in vitro*, o delineamento racional de formulações destinados ao uso oral é favorecido (AMIDON et al., 1995; WAGH; PATEL, 2013). Qualquer fármaco, para ser absorvido, deve estar presente na forma de solução no local de absorção. Sendo assim, além da permeabilidade, a solubilização e a dissolução nos fluidos gastrointestinais são fatores que governam a biodisponibilidade (LOBENBERG; AMIDON, 2000; WAGH; PATEL, 2013). Para fármacos com baixa solubilidade, a velocidade de dissolução nos fluidos biológicos é o fator limitante da disponibilidade biológica após administração oral, tendo a dissolução, papel importante no delineamento de formas farmacêuticas com o desempenho terapêutico pretendido (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

A biodisponibilidade dos fármacos classe II é limitada pela velocidade de dissolução. Contudo, em função da alta permeabilidade, tais fármacos são sujeitos a pesquisas para o aumento da solubilidade e várias abordagens de formulação para

estes têm sido propostas. No caso de compostos de fármacos incluídos na classe IV do SCB, a biodisponibilidade é limitada tanto pela dissolução como pela permeabilidade intestinal, sendo estes fármacos considerados pobres candidatos ao desenvolvimento de medicamentos para uso oral (PRAKASH et al., 2014). Não existe na literatura, informações acerca da classificação da FZD no SCB. Uma vez que o fármaco é de natureza lipofílica e apresenta baixa solubilidade em água, sua dissolução no meio será, provavelmente, o fator limitante da sua biodisponibilidade. A possibilidade de melhorar a solubilidade da FZD pode impactar, também, na redução da dose a ser administrada, o que permite contornar os problemas de toxicidade dose-dependente relacionadas ao seu uso, justificando o interesse no presente estudo.

Uma vez que a baixa solubilidade aquosa e a dissolução dos fármacos determinarão o desempenho das formulações orais, aprimorar a solubilidade se constitui como um grande desafio para os formuladores que atuam no desenvolvimento de medicamentos de uso oral ou intencionadas para uso parenteral (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; PRAKASH et al., 2014). Diferentes tecnologias, baseadas em modificações físicas e químicas, podem ser empregadas com o intuito de aumentar a solubilidade de fármacos e assegurar uma taxa de dissolução que modifique, positivamente, a biodisponibilidade. Artíficos farmacotécnicos usualmente empregados são a diminuição da granulometria de partículas ao tamanho micrométrico, a formação de dispersões sólidas, a preparação de co-cristais, a formação de micelas poliméricas, a obtenção de sistemas micro e nanoparticulados e a formação de complexos a partir de excipientes (HU; JOHNSTON; WILLIAMS, 2004; KRISHNAIAH, 2010; PAWAR ANIL; CHOUDHARI PRAVIN, 2012; PRAKASH et al., 2014; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; WILLIAMS et al., 2013).

Dentre os excipientes empregados para incrementar a solubilidade, destacam-se as ciclodextrinas (CDs), moléculas denominadas hospedeiras com as quais moléculas hóspedes se associam, formando os complexos de inclusão (PRAKASH et al., 2014). A principal vantagem do uso da CD quando comparada com outros co-solventes e surfactantes é, que no primeiro caso, o fármaco permanecerá em solução independente de alterações que podem ocorrer no sistema como, por exemplo, a diluição ou adição de solvente (JAMBHEKAR; BREEN, 2016). Aliado ao interesse do aumento da solubilidade do fármaco, é frequentemente relatado na literatura que substâncias lipofílicas tendem a apresentar maior citotoxicidade quando comparadas aos compostos hidrofílicos devido à maior permeabilidade dessas moléculas nas

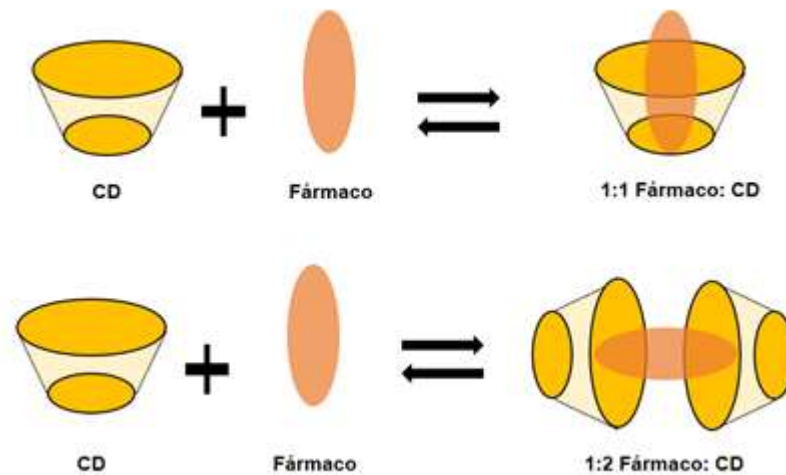
membranas celulares. A complexação com ciclodextrinas pode, mediante aumento da solubilidade e/ou diminuição da permeabilidade, favorecer a diminuição da toxicidade (CORRÊA et al., 2005; LYRA et al., 2012).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados a partir da digestão bacteriana da celulose pela ação da enzima amilase ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase), proveniente do *Bacillus macerans*. As CDs se apresentam como cones truncados devido à conformação assumida pelas unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose ( $\alpha$ -1,4) que se unem em 7, 8 ou 9 unidades para dar origem à  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente, dando origem às CDs naturais de maior interesse na área farmacêutica. Cada unidade de glicopiranosose possui 3 grupos hidroxila (OH) livres posicionados na superfície da estrutura, o que favorece a interação com a água mediante a formação de ligação de hidrogênio. Por outro lado, o interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos hidrogênios e pelo oxigênio da ligação éter das cadeias carbônicas, o que lhe confere caráter hidrofóbico e favorece interações fracas do tipo van der Waals e dipolo-dipolo. Tal distribuição confere às CDs uma característica anfifílica, peculiaridade que a torna útil no preparo de complexos de inclusão (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON et al., 2005).

A formação de complexos de inclusão com as CDs desperta o interesse da realização de estudos em diversas áreas tais como a agrícola, química, farmacêutica, alimentícia, cosmética e ambiental. Entre os objetivos da complexação, os principais são: (i) Incrementar a solubilidade e a taxa de dissolução de fármacos; (ii) Melhorar a biodisponibilidade dos fármacos e de outras substâncias químicas de interesse; (iii) Aumentar a estabilidade das moléculas; (iv) Melhorar as propriedades organolépticas mediante mascaramento do odor, sabor e da cor; (v) Modificar a reatividade química das substâncias incluídas; (vi) Fixar fármacos voláteis; (vii) Controlar a liberação de fármacos; entre outras (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; MARTIN DEL VALLE, 2004; LOFTSSON et al., 2005).

Uma das principais características das ciclodextrinas que determina a formação do complexo de inclusão é a presença da cavidade hidrofóbica, cujo diâmetro varia conforme o tipo de CD. Tal parâmetro, juntamente com a constante de associação, governam a estequiometria da complexação, dada pela relação entre o número de moléculas hóspedes e hospedeiras (DAVIS; BREWSTER, 2004). Conforme Veiga, Pecorelli e Ribeiro (2006), as relações estequiométricas mais usuais para a formação de complexos são as de uma molécula de fármaco para uma de CD (1:1) e de uma

molécula de fármaco para duas de CD (1:2), como representado na Figura 2. Ainda segundo os autores, a maioria das moléculas hóspedes complexadas com  $\beta$ -CD deve possuir massa molar compreendida entre 100 e 400 Daltons.



**Figura 2.** Representação esquemática da formação de complexos fármaco:CD nas razões molares 1:1 e 1:2.

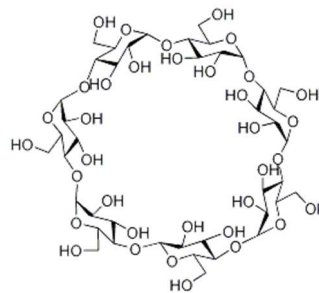
FONTE: Adaptado de Davis e Brewster, 2004.

Apesar do relato de trabalhos que empregam outras razões molares fármaco:CD (como 1:3 e 1:4), entre outras, é importante que seja empregada a menor concentração possível do excipiente, uma vez que proporções maiores inviabilizaria o preparo de qualquer forma farmacêutica (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

As principais CDs naturais estudadas são a  $\alpha$ , a  $\beta$  e a  $\gamma$ -ciclodextrina. A  $\beta$ -ciclodextrina amplamente utilizada em complexos de inclusão devido ao tamanho da sua cavidade, eficiência na complexação e preço relativamente baixo. Derivados semissintéticos também têm sido explorados, tais como a 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, o sal sódico de sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina, a  $\beta$ -ciclodextrina metilada randômica e a 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -ciclodextrina. A 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina destaca-se em complexos de inclusão devido sua solubilidade (RAJPUT, PATEL, TRIVEDI, 2016; SINHA et al., 2005).

### 2.3.1 $\beta$ -ciclodextrina

A  $\beta$ -ciclodextrina, também conhecida pelos nomes de ciclomalto-heptose, ciclo-heptamilose, ciclo-heptaglucano ou  $\beta$ -dextrina de Schardinger), é uma CD natural que possui sete unidades de glicopiranosose, como representado na Figura 3. Atualmente, a  $\beta$ -CD é a CD mais estudada e mais utilizada na preparação de medicamentos comercialmente disponíveis (MARTIN DEL VALLE, 2004). Sua monografia está inscrita no *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) juntamente com as demais CDs naturais. No entanto, existem relatos de nefrotoxicidade associada à  $\beta$ -CD e seu uso em formulações de uso parenteral é restrito (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).



**Figura 3.** Estrutura molecular da  $\beta$ -ciclodextrina.

FONTE: Arquivo pessoal.

A  $\beta$ -CD possui massa molar de 1135 g/mol e solubilidade em água de 18,5 mg/mL, a 25 °C. Além da origem natural da  $\beta$ -CD, as principais vantagens associadas ao seu uso são o diâmetro e o volume da cavidade hidrofóbica (6,0 a 6,5 Å e 262 Å, respectivamente), o que lhe confere boa capacidade de inclusão; a baixa toxicidade relatada, relacionada ao seu uso; e, o menor preço quando comparado ao das demais ciclodextrinas (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

Há relatos na literatura acerca da preparação de medicamentos baseados na  $\beta$ -ciclodextrina. Demicheli e colaboradores (2004) prepararam complexos de inclusão entre  $\beta$ -CD e antimoniato de meglumina em diferentes proporções molares por meio do método de liofilização e estudaram a atividade leishmanicida dos complexos. A eficácia antileishmania foi avaliada em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. amazonensis*. Animais tratados diariamente com o complexo pela via oral desenvolveram lesões significativamente menores do que aqueles tratados com antimoniato de meglumina. Segundo os autores, os dados mostraram claramente a relação estabelecida entre a complexação e a melhor biodisponibilidade do antimônio pela via oral. Frézard e colaboradores (2008)

observaram que o mesmo complexo (antimoniato de meglumina: $\beta$ -CD por liofilização) foi capaz de atuar como um sistema de liberação sustentada do fármaco, sugerindo que essa propriedade do complexo pode resultar em uma mudança do local de absorção do fármaco no trato gastrointestinal.

Corrêa e colaboradores (2005) examinaram a citotoxicidade do complexo desidrocrotonina: $\beta$ -CD (1:2) preparado por coevaporação para avaliar sua utilidade em reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia farmacológica do fármaco. O complexo obtido foi menos citotóxico que a desidrocrotonina livre em todos os ensaios utilizando culturas primárias de hepatócitos de rato e fibroblastos V79.

Lopes e colaboradores (2011) avaliaram a citotoxicidade e os efeitos tripanomicidas do complexo metronidazol: $\beta$ -CD contra formas amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, mediante a realização de testes *in vitro*. Segundo os autores, o complexo e o fármaco puro exibiram a mesma atividade tripanocida e toxicidade em células de mamíferos. No entanto, a complexação via inclusão aumentou a solubilidade do fármaco em água em 1,7 vezes.

Sobrinho e Soares (2011) prepararam complexos de inclusão entre o benznidazol e a  $\beta$ -CD e perceberam o aumento da solubilidade e melhoria drástica na taxa de dissolução do fármaco após a formação dos CIs.

Estudos envolvendo a complexação do piroxicam com a  $\beta$ -CD comprovaram a eficiência do CI em melhorar a biodisponibilidade do fármaco e demonstraram a redução dos efeitos irritantes que este tem sobre a mucosa gastrointestinal (SCARPIGNATO, 2013). Dharmasthala e colaboradores (2019) prepararam filmes orais de dispersão rápida contendo o complexo piroxicam: $\beta$ -CD com vistas à melhorar a adesão de pacientes geriátricos e pediátricos à farmacoterapia anti-inflamatória. Os autores observaram que a tecnologia produziu formas farmacêuticas que liberaram o fármaco rapidamente e que pode ser considerada promissora.

Mendes e colaboradores (2016) produziram CIs entre a  $\beta$ -CD e a hidroclorotiazida com o objetivo de melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade do fármaco, que pertence à classe IV do SCB (baixa solubilidade e alta permeabilidade). De acordo com os autores, a complexação foi efetiva para incrementar as propriedades do fármaco e o uso da  $\beta$ -CD foi considerado promissor.

Alguns exemplos de medicamentos preparados a partir da complexação de fármacos com a  $\beta$ -CD que já são comercializados são apresentados no Quadro 1.

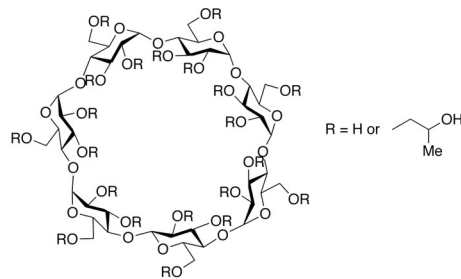
**Quadro 1.** Medicamentos disponíveis no mercado nacional e internacional preparados a partir de fármacos complexados com a  $\beta$ -CD (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007; GUEDES et al., 2008; OLIVEIRA, SANTOS, COELHO, 2009)

<b>Fármaco</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Forma farmacêutica</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Indicação</b>
difenidramina	Stada-Travel®	Comprimido mastigável	Stada	Antiemético
dexametasona	Glymesason®	Creme	Fujinaga	Analgésico
minoxidil	Alopexy®	Solução	Pierre Fabre	Hipotensão
metronidazol	Nidagel®	Gel vaginal	Tolmar	Antiparasitário
nimesulida	Nimedex®	Comprimido	Novartis	Anti-inflamatório
omeprazol	Omebeta®	Comprimido	Betapharm	Antiulceroso
piroxicam	Brexin®	Comprimido	Masterpharma	Anti-inflamatório
	Cicladol®	Grânulo		
	Flofene®	Supositório		
	Flogene®	Cápsula	Aché	
prostaglandina e2	Prostarmon E®	Comprimido sublingual	Ono	Indução do parto
drospirenona e etinilestradiol	YAZ®	Comprimido	Bayer	Contraceptivo oral

### 2.3.2 Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

A 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) é uma CD sintética, obtida por modificação química da  $\beta$ -CD, mediante substituição do H pelo grupo  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ . A representação da sua estrutura química é dada na Figura 4. A HP $\beta$ CD possui massa molar de 1400 g/mol e apresenta maior solubilidade em água que a  $\beta$ CD (> 600 mg/mL, a 25 °C), sendo esta a principal vantagem associada ao seu uso (JAMBHEKAR; BREEN, 2016). Estudos apontam que a HP $\beta$ CD possui baixa toxicidade e é bem tolerado em animais (GOULD; SCOTT, 2005).





**Figura 4.** Estrutura molecular da 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

FONTE: Arquivo pessoal.

Zhang e colaboradores (2009) prepararam complexos HP $\beta$ CD:insulina com a intenção de otimizar a estabilidade da proteína em meio ácido e básico e obtiveram resultados satisfatórios em diferentes meios.

Wen e colaboradores (2010) prepararam complexos naringenina:HP $\beta$ CD em diferentes razões molares (1:1, 1:2, 1:3 e 1:4) e os resultados das análises da solubilidade por cromatografia líquida de alto desempenho mostram que a solubilidade do flavonóide aumentou de 4,38  $\mu\text{g/mL}$  para 1272,31  $\mu\text{g/mL}$ .

Domańska, Pelczarska e Pobudkowska (2011) prepararam CIs entre a HP $\beta$ CD e fármacos derivados do ácido antranílico e comprovaram o aumento da solubilidade para os complexos preparados na razão molar 1:1.

Bhise (2011) preparou complexos entre o fenofibrato e a HP $\beta$ CD na razão molar 1:1 pelo método de *spray-drier* e os estudos de dissolução demonstraram que a porcentagem de dissolução foi aumentada quando comparado ao fármaco puro. Resultados semelhantes foram obtidos por Vlachou e Papaiöannou (2003), que prepararam complexos entre a HP $\beta$ CD e a furosemida, um diurético amplamente prescrito.

Yang e colaboradores (2016) obtiveram complexos de inclusão entre o tamibaroteno e a HP $\beta$ CD e notaram uma melhora na dissolução do fármaco complexado comparado com o fármaco livre, com dissolução de aproximadamente 97%. Já os estudos *in vivo* mostraram que o complexo apresentou  $AUC_{0-\infty}$  (área sob a curva de concentração-tempo de zero a infinito) 2,79 vezes superior à do fármaco livre.

Hao e colaboradores (2017) prepararam complexos de inclusão entre a artemisina e a HP $\beta$ CD na razão molar 1:40, por diferentes métodos, com vistas a obter

maior solubilidade e biodisponibilidade oral para o fármaco antimalárico. A porcentagem de liberação do fármaco complexado foi de 82% após 30 minutos enquanto que para o fármaco livre, a porcentagem liberada foi de 18%.

Zhang e colaboradores (2018) prepararam complexos de inclusão toltrazuril:HP $\beta$ CD e avaliaram a biodisponibilidade em coelhos, obtendo seu incremento para a forma complexada. Alguns exemplos de medicamentos comercialmente disponíveis, preparados a partir da HP $\beta$ CD, são dados no Quadro 2.

**Quadro 2.** Medicamentos disponíveis no mercado nacional e internacional preparados a partir de fármacos complexados com a HP $\beta$ CD (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007; GUEDES et al., 2008; OLIVEIRA, SANTOS, COELHO, 2009)

<b>Fármaco</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Forma farmacêutica</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Indicação</b>
cisaprida	Propulsid <sup>®</sup>	Supositório	Janssen	Estimulante TGI
diclofenaco	Voltarol <sup>®</sup>	Solução oftálmica	Novartis	Anti-inflamatório
hidrocortisona	Dexacort <sup>®</sup>	Solução bucal	Actavis	Anti-inflamatório
indometacina	Indocid <sup>®</sup>	Solução oftálmica	Chauvin	Anti-inflamatório
itraconazol	Sporanox <sup>®</sup>	Solução IV	Janssen	Antifúngico
mitomicina	MitoExtra <sup>®</sup>	Solução IV	Novartis	Antibiótico e antineoplásico

### 2.3.3 Métodos de preparo e caracterização de complexos de inclusão

Inúmeras técnicas de complexação estão descritas na literatura e a preparação dos complexos de inclusão se dá tanto em meio sólido como em meio líquido. Neste último, os procedimentos podem ocorrer em solução ou em suspensão. Alguns dos métodos descritos são malaxagem, atomização (*spray drying*), coevaporação, coprecipitação, neutralização, liofilização (*freeze drying*), ciclos congelamento-descongelamento e fluidização supercrítica (CHEIRSILP; RAKMAI, 2016). Artíficos

como a ionização do fármaco, modificação do pH do meio, uso de aquecimento no processo, emprego de cossolventes e o uso de polímeros solúveis, dentre outros, podem ser utilizados para melhorar a eficiência da complexação. Na escolha do método, a escala de preparo e a possibilidade de transposição de escala devem ser consideradas (RODRIGUEZ- PEREZ et al., 2006).

A complexação por malaxagem, um dos métodos escolhidos para a realização do presente trabalho, é o procedimento preferido para fármacos de solubilidade muito baixa em água e envolve a formação de uma pasta, em geral com pistilo ou em misturadores malaxadores, após adição de um líquido sobre a mistura da CD e o fármaco. A mistura é malaxada constantemente e uma pequena quantidade do líquido molhante é adicionada com a intenção de manter a consistência da pasta. Ao final do processo, a pasta é seca à vácuo. O método é simples e barato, porém, pode ser demorado, não sendo considerado o de escolha para utilização em grande escala (CHEIRSILP; RAKMAI, 2016; MARTIN DEL VALLE, 2004). Já a liofilização, outra técnica utilizada, ocorre em meio líquido, sendo indicada para fármacos de maior solubilidade em água e substâncias termolábeis. No método, a CD e o fármaco devem ser dispersos na água ou em mistura hidroalcolica, sob agitação. Em seguida, a mistura é liofilizada. O processo é passível de ser utilizado em grande escala (CHEIRSILP; RAKMAI, 2016; MARTIN DEL VALLE, 2004).

Após a complexação, faz-se necessário verificar o sucesso da formação dos complexos mediante o emprego de técnicas analíticas adequadas. A escolha do método baseia-se na sensibilidade do mesmo em detectar as modificações das propriedades físico-químicas que ocorrem após a complexação, tanto do fármaco como das CDs (SINGH et al., 2010). De acordo com Takahashi, Veiga e Ferraz (2012a), várias técnicas analíticas são necessárias para caracterizar os complexos de inclusão com ciclodextrinas, sendo os métodos complementares entre si. As principais técnicas usualmente empregadas bem como os parâmetros avaliados em cada uma são sumarizadas no Quadro 3.

**Quadro 3.** Técnicas utilizadas na caracterização de complexos de inclusão (LYRA et al., 2010)

Técnica	Parâmetros pesquisados
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Qualitativo. Avalia alterações na morfologia das partículas (amorfização).

Diagramas de solubilidade de fases	Quantitativo. Analisa os efeitos da adição do agente complexante sobre o composto a ser solubilizado, permitindo obter a constante de estabilidade ( $K_c$ ) e a estequiometria de formação do complexo.
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Qualitativo e quantitativo. Permite visualizar as interações que ocorrem entre as moléculas hóspedes e as CDs, sendo capaz de diferenciar qual parte da estrutura química do fármaco está sendo complexada.
Espectroscopia no ultravioleta	Quantitativo e qualitativo. É baseado na propriedade das espécies absorverem determinados comprimentos de onda da radiação.
Modelagem molecular	Qualitativo. Analisa como se procede a formação dos complexos de inclusão e a orientação dos fármacos nas cavidades das CDs
Análise termogravimétrica (TG/DTG)	Quantitativo e qualitativo. Avalia a variação da perda de massa referente aos eventos térmicos, especialmente, desidratação e fusão.
Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	Quantitativo e qualitativo. Acompanha a variação de entalpia dos eventos térmicos que ocorrem na amostra em relação a um material de referência termicamente inerte.
Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	Qualitativo. Detecta mudanças significativas na intensidade e região da bandas nos espectros vibracionais dos grupos funcionais das moléculas envolvidas na complexação.
Difração de raios-X (DRX)	Qualitativo. Compara os difratogramas das substâncias puras e do complexo formado, onde o difratograma do complexo formado é

	claramente diferente daqueles dos componentes individuais.
Espectroscopia RAMAN	Qualitativo e Quantitativo. Detecta mudanças significativas nas vibrações simétricas, grupos não-polares, bandas homoatômicas e realiza caracterização espectroscópica da cristalinidade.

Entre os inúmeros métodos disponíveis para avaliação do sucesso da complexação, no presente trabalho foram escolhidos aqueles baseados na modificação das propriedades térmicas e na cristalinidade dos compostos formados, a saber: DSC, TG/DTG, DRX, RMN de carbono no estado sólido e espectrometria RAMAN.

As termoanálises envolvem um grupo de técnicas nas quais uma ou mais propriedades físicas de dado material podem ser medidas em função da temperatura e/ou tempo, enquanto é submetido a um programa controlado de temperatura. As técnicas termoanalíticas mais empregadas para estudar a complexação com ciclodextrinas são a calorimetria exploratória diferencial (DSC), a termogravimetria (TG, DTG) e a análise térmica diferencial (DTA) (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; SINGH et al., 2010; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012a).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é considerada uma técnica confiável para investigar o processo de complexação devido a sua sensibilidade em detectar alterações nos perfis termoanalíticos das amostras. Apresentam eventos endotérmicos de desidratação, dessa forma a molécula hóspede está em sua forma cristalina e é apresentada com pico bem definido correspondente ao seu ponto de fusão. Quando ocorre a formação de complexo, espera-se que o pico de fusão desapareça, mude ou amplie devido à perda da cristalinidade causada pelo encapsulamento. Pela análise de DSC pode-se obter a temperatura máxima ( $T_{peak}$ ), variação de entalpia ( $\Delta H$ ) e temperatura de transição ( $T_{on}$  e  $T_{end}$ ) sendo ferramentas úteis para comparação entre o complexo e os materiais de partida. (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001).

A TG relaciona a variação da massa da amostra em função da temperatura, sob determinadas condições atmosféricas, originando curvas que fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, de produtos

intermediários e de resíduos formados durante transformações físicas (evaporação, condensação ou sublimação) ou químicas (decomposição ou oxidação). As inflexões observadas nas curvas são dependentes da estrutura e da extensão das forças de interação existentes nos componentes do material e podem ser observadas mediante a formação de ombros ou “degraus”. A termogravimetria diferencial (DTG) é a primeira derivada da curva da TG. Na DTG, os “ombros” correspondentes às variações de massa da curva TG são substituídos por picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa. A partir da altura do pico, a qualquer temperatura, é possível obter a variação de massa e as temperaturas correspondentes ao início e final da reação com maior precisão sendo, especialmente útil, em eventos que envolvem sobreposição de reações. Já a DTA é a técnica pela qual a diferença de temperatura entre a substância e o material de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura. As curvas DTA representam os registros de  $\Delta T$  em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001).

Além das técnicas baseadas na alteração das propriedades térmicas, métodos baseados na modificação da cristalinidade dos compostos também se mostram úteis para a comprovação da formação de complexos. Moléculas que apresentam diferentes formas cristalinas possuem, também, diferentes propriedades físico-químicas, entre elas, a solubilidade com consequente modificação da biodisponibilidade (AGUIAR; GEMAL; SAN GIL, 1999). A difração de raios X (DRX) é um método cristalográfico rápido e fácil que permite a verificação da complexação mediante a detecção de alteração na estrutura cristalina do complexo (RAOOV; MOHAMED; ABAS, 2014). As CDs, em seu estado cristalino, formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que estabilizam a conformação da molécula e sua estrutura, gerando difratogramas bem definidos. Se ocorrer complexação, a cristalinidade das partículas é reduzida, com alterações nos perfis de difração da amostra (ABARCA et al., 2016). Assim, diminuição da cristalinidade do material e amorfização dos compostos é um forte indício de sucesso da complexação (SONGKRO et al., 2012). Na interpretação da técnica, nota-se os tipos e tamanhos dos picos formados na análise das matérias-primas, dos complexos e das misturas físicas. Picos estreitos e de tamanho reduzido, sem definição, são característicos de material amorfo, podendo ser indicativo da ocorrência de complexação. Ainda, uma diminuição nos picos pode representar a ocorrência de complexação parcial, já que

indica a presença de material de partida não complexado, que permaneceu na forma cristalina. Quando os difratogramas das misturas físicas são comparados com os dos complexos e dos materiais de partida, observa-se, geralmente, a sobreposição de picos do hóspede e do hospedeiro (TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012b).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das mais úteis técnicas para estudar interações de ciclodextrinas com hospedeiros. Diferentes técnicas de RMN usadas para caracterização de complexos de inclusão que envolve desde técnicas simples como espectros de RMN de hidrogênio (HRMN) até experimentos mais sofisticados, por exemplo, a espectroscopia ordenada por difusão (DOSY), Espectroscopia rotativa por efeito *Overhause* (ROESY) e RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido através de CP/MAS (PESSINE; CALDERINE; ALEXANDRINO, 2012).

Informações estruturais sobre CIs podem ser obtidas usando RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido (VOGT; STROHMEIER, 2012). A técnica provê informações acerca da organização molecular à curta distância das moléculas hóspede e hospedeira, a partir da determinação das diferenças existentes nos desvios químicos e modificações dos compostos livres comparados com os complexos (GÜNTER, 1994). No entanto, é preciso ter cuidado nesta análise, uma vez que esse fenômeno também pode ser visualizado em outras situações que levam à amorfização das amostras, como na liofilização (PESSINE; CALDERINE; ALEXANDRINO, 2012). Além disso os picos usando RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido são difíceis de observar devido forte sobreposição. Para contornar tais problemas uma célula contendo a amostra é rotacionada em torno do ângulo mágico (*magical angle spinning - MAS*) para fazer desaparecer a anisotropia de deslocamento químico. Assim, quando combinada com a técnica com a polarização cruzada (CP), é possível estreitar as linhas de ressonância e obter espectros CP/MAS de alta resolução (GÜNTER, 1994).

A espectroscopia Raman é uma técnica de identificação derivada de um processo de espalhamento de luz que permite informações químicas e caracterização espectroscópica de cristalinidade. É uma técnica valiosa na identificação de formação de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas como complexante pelo silêncio da molécula de CD que não apresenta qualquer sobreposição nos padrões espectrais, dessa forma é possível realizar uma melhor comparação entre o fármaco livre e o complexo de inclusão (OLIVEIRA et al., 2011; VAJNA et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, R.L., RODRIGUEZ, F.J., GUARDA, A., GALOTTO, M.J., BRUNA, J.E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v.196, p.968-975, 2016.
- AGUIAR, M.R.M.P., GEMAL, A.L., SAN GIL, R.A.S. Caracterização de polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado sólido. **Química Nova**, v.22, n.4, p.553-564, 1999.
- AHMED, I., KASRAIAN, K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.871-882, 2002.
- ALAM, M., PAGET, T., ELKORDY, A.A. Formulation and advantages of furazolidone in liposomal drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n.84, p. 139-145, 2016.
- ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., DEN, BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos one**, v.7, n.5, 2012.
- AMIDON, G.L., LENNERNAS, H., SHAH, V.P., CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.
- BERMAN, J.D., LEE, L.S. Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages in vitro. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 947-951, 1983.
- BHISE, S.D. Effect of Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin Inclusion Complexation on solubility of fenofibrate. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n.2, p. 596-604, 2011.
- BOSQUESI, P.L.; ALMEIDA, A.E.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.3, p. 231-238, 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BREWSTER, M. E., LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 7, p. 645-66, 2007.
- CARVALHO, S.G., SIQUEIRA, L.A., ZANINI, M.S., MATOS, A.P.S., QUARESMA, C.H., SILVA, L.M., ANDRADE, S.F., SEVERI, J.A., VILLANOVA, J.C.O. Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based  $\beta$ -



cyclodextrin complexes in *Leishmania amazonensis*. **Research in Veterinary Science**, v.119, p. 143-153, 2018.

CHAUDHARY, A., NAGAICH, U., GULATI, N., KHOSA, R.L. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: a recent review. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v.2, n.1, p.32-67, 2012.

CHEIRSILP, B., RAKMAI, J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. **Biology, Engineering and Medicine**, v.2, n.1, p.1-6, 2016.

CORRÊA, D.H.A., MELO, P.S., CARVALHO, C.A.A., AZEVEDO, M.B.M., HAUN, N., M. Dehydrocrotonin and its  $\beta$ -cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes, **European Journal Pharmacology**, v.510, p. 17-24, 2005.

COSTA, P., SOUSA LOBO, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p. 123-133, 2001.

CROFT, S. L., SEIFERT, K., YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, p. 399-410, 2006.

CUNHA-FILHO, M.S.S., SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.1-9, 2007.

DHARMASTHALA, S., SHABARAYA, A.R., ANDRADE, G.S., SHRIRAM, R.G., HEBBAR, S., DUBEY, A. Fast dissolving oral film of Piroxicam: Solubility enhancement by forming an inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin, formulation and evaluation. **Journal of Young Pharmacists**, v.11, n.1, p.1-6, 2019.

DAVIS, M.E., BREWSTER, M.E. Cyclodextrin based-pharmaceutics: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.12, p.1023-2035, 2004.

DE ANGELIS, I., ROSSI, L., PEDERSEN, J.Z., VIGNOLI, A.L., VINCENTINI, O., HOOGENBOOM, L.A., POLMAN, T.H., STAMMATI, A., ZUCCO, F. Metabolism of furazolidone: alternative pathways and modes of toxicity in different cell lines. **Xenobiotica**, v. 24, p.1157–1169, 1999.

DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; SILVA, J.B.B; FALCÃO, C.A.B.; ROSSI-BERGMAN, B.; SINISTERRA, R.D.; FRÉZARD, F. Oral delivery of meglumine antimoniate- $\beta$ -cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. **AOAC**, v.48, n.1, p.100-103, 2004.

DOMANSKA, U., PELCZARSKA, A., POBUDKOWSKA, A. Effect of 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on Solubility of Sparingly Soluble Drug Derivatives of Anthranilic Acid. **Molecules**, v.15, n.4, p.4401-4407, 2010.

EISIG, J.N., SILVA, F.M., RODRIGUEZ, T.N., HASHIMOTO, C.L., BARBUTI, R.C. A furazolidone-based quadruple therapy for *Helicobacter pylori* retreatment in patients with peptic ulcer disease. **Clinics**, v.60, n.6, p.485-488, 2005.

FALQUETO, A., SESSA, P.A., FERREIRA, A.L., VIEIRA, V.P., SANTOS, C.B., VAREJÃO, J.B.M., CUPOLILLO, E., PORROZZI, R., CARVALHO-PAES, L.E., GRIMALDI JR, G. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.8, p. 1003-1010, 2003.

FRÉZARD, F.; MARTINS, P.S.; BAHIA, A.P.C.O.; LE MOYEC, L.; DE MELO, A.L.; PIMENTA, A.M.C.; SALERNO, M.; SILVA, J.B.B.; DEMICHELI, C. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ $\beta$ -cyclodextrin nanoassemblies. **International Journal Pharmaceutic**, v.347, p.102-108, 2008.

GASHEVA, L.M., KALINKOVA, G., MINKOV, E, KRESTEV, V. IR spectroscopic investigations of amoxicillin trihydrate, included in the technological models sirup granules in ethylcellulose. **Journal do Molecular Structure**, v. 115, p.323–326, 1984.

GIORDANO, F., NOVAK, C., MOYANO, J.R. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v.380, p.123-151, 2001.

GONTIJO, B.B.; PAVÃO, F.F.; SILVA, F.S.A.; SILVA, F.D.; TAVARES, G.C.; COELHO, G.L. Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **Pubvet**, v.5, n.38, p.1-19, 2011.

GONTIJO, B., CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GOULD, S., SCOTT, R.C. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.1451-1459, 2005.

GRADONI, L. Epizootiology of canine leishmaniasis in Southern Europe. In: KILLICK-KENDRICK, R. (ed) Canine leishmaniasis: na update. **Hoechst Roussel Vet, Romainville cedex**, p. 32–39, 1999.

GUEDES, F.L., ALVES, G.M.C., SANTOS, F.L.A., LIMA, F.L., ROLIM, L.A., NETO, P.J.R. Cilodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.3, p.220-225, 2008.

GÜNTER, H. **NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry**, 2.ed, 1994.

HAO, Y., CHEN, S., TIAN, L., YANG, Z., HUANG, G. Inclusion Complex of Artemether with 2-Hydroxypropyl - $\beta$ -Cyclodextrin for the Treatment of Malaria: Preparation, Characterization and Evaluation. **MOJ Bioequivalence & Bioavailability**, v. 3, n.6, 2017.

HEUSSER JÚNIOR, A., BELLATO, V., SOUZA, A.P., MOURA, A.B., SARTOR A.A., SANTOS, E.G.O.B., SILVA V.L. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.6, p.713-718, 2010.

HU, J., JOHNSTON, K.P., WILLIAMS, R.O. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.30, p. 233-245, 2004.

HUNDER, G.; SCHMID, A; MAYRING, L. Investigations on the metabolic degradation of the side chain of furazolidone. **Archives of Toxicology**, v.61, n.2, p.161-163, 1987.

JAMBHEKAR, S.S., BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p.356-362, 2016.

JIANG, X., SUN, L., QIU, J.J., SUN, X., LI, S., WANG, X., SO, C.W., DONG, S. A novel application of furazolidone: anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia. **Plos One**, v.8, n.8, 2013.

KON, K., RAI, M. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**, 1.ed, 436 p., 2015.

KRISHNAIAH, Y.S.R. Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. **Journal of Bioequivalence and Bioavailability**, v. 2, p.28-36, 2010.

LAURENTI, M.D. Patologia e patogenia das leishmanioses. 2010. 140 f. Tese (Livre Docência) – Departamento de patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LOFTSSON, T., JARHO, P., MÁSSON, M., JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in drug. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.2, n.2, p. 335-351, 2005.

LÖBENBERG, R., AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, n.1, p.3-12, 2000.

LOPES, M.S., SALES JR, P.A.S., LOPES, A.G.F., YOSHIDA, M.I., SILVA, T.H.A.S., ROMANHA, A.J., ALVES, R.J., OLIVEIRA, R.B. The activity of a metronidazole analogue and its  $\beta$ -cyclodextrin complex against *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.8, p.1055-1057, 2011.

LYRA, M.A.M., SOARES-SOBRINHO, J.L., FIGUEIREDO, R.C.B.Q., SANDES, J.M., LIMA, A.A.M., TENÓRIO, R.P., FONTES, D.A.F., SANTOS, F.L.A., ROLIM, L.A., ROLIM-NETO, P.J. Study of benznidazole–cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity, **Journal of inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, p.397-404, 2012.

MARTIN DEL VALLE, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v.39, n.9, p.1033-1046, 2004.

MENDES, C., BUTTCHEVITZ, A., KRUGER, J.H., KRATZ, J.M., SIMÕES, C.M., DE OLIVEIRA BENEDET, P., OLIVEIRA, P.R., SILVA, M.A. Inclusion complexes of

hydrochlorothiazide and  $\beta$ -cyclodextrin: Physicochemical characteristics *in vitro* and *in vivo* studies. **European Journal Pharmaceutics Sciences**, v.83, p. 71-78, 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (MAPA). Portaria Interministerial nº 1426/2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008.

MIRAJKAR, R.N., DEVKAR, M.S., KOKARE, D.R. Taste masking methods and agents in pharmaceutical formulations. **International Journal Pharmaceutic**, v.3, p.60-70, 2012.

NEAL, R.A., BUEREN, J., HOOPER, J. The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major* and *L. enriettii* *in vitro* and *in vivo*. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v.82, n.5, p.453-456, 1988.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e a sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v.6, p.70-83, 2009.

OLIVEIRA, V.E., ALMEIDA, E.W.C., CASTRO, H.V., EDWARDS, H.G.M., SANTOS, H.F., OLIVEIRA, L.F.C. Carotenoids and  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **The Journal of Physical Chemistry**, v.115, p.8511-8519, 2011.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS/OMS). **Brasil: Leishmaniose cutânea e canina 2016**, 2016.

PASSOS, S.R., RODRIGUES, T.A., MADUREIRA, A.P., GIUNCHETTI, R.C., ZANINI, M.S. Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.44, n.5, p.463-465, 2014.

PAWAR ANIL, R., CHOUDHARI PRAVIN, D. Novel techniques for solubility, dissolution rate and bioavailability enhancement of class II and IV drugs. **Asian Journal of Biomedical & Pharmaceutical sciences**, v.2, n.3, p. 9-14, 2012.

PESSINE, F.B.T., CALDERINI, A., ALEXANDRINO, G.L. Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. **Magnetic Resonance Spectroscopy**, 264 p., 2012.

PINTO, I.S., LOSS, A.C.C., FALQUETO, A., LEITE, Y.L.R. Pequenos mamíferos não voadores em fragmentos de mata atlântica e áreas agrícolas em Viana, Espírito Santo, Brasil. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.355-360, 2009.

PRAKASH, K., JIEUN, R., HYEONGMIN, K., IKSOO, K., JEONG, T.K., HYUNIL, K., JAE, M.C., GYIAE, Y, & JAEHWI, L. Pharmaceutical particle technologies: an approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 9, p. 304-316, 2014.

RAJPUT, K.N.; PATEL, K.C.; TRIVEDI, U.B.  $\beta$ -Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkaliphile Microbacterium terrae KNR 9 Using Different Starch Substrates. **Biotechnology Research International**, v.2016, 2016.

RAOOV, M.; MOHAMAD, S.; ABAS, M.R. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin functionalized ionic liquid polymer as a macroporous material for the removal of phenols and As(V). **International Journal of Molecular Sciences**. v.15, p.100-119, 2014.

REIMÃO, J.Q., TANIWAKI, N.N., TEMPONE, A.G. Furazolidone is a selective in vitro candidate against Leishmania (L.) chagasi: an ultrastructural study. **Parasitology Research**, v.106, n.6, p.1465-1469, 2010.

RODRIGUEZ-PEREZ AI, RODRIGUEZ-TENREIRO C, ALVAREZ-LORENZO C, CONCHEIRO A, TORRES-LABANDEIRA JJ. Drug solubilization and delivery from cyclodextrin-pluronic aggregates. **Journal Nanosciences and Nanotechnology**, v. 6, p.3179-3186, 2006.

ROWE, R.C., SHESKEY, P.J., QUINN, M.E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th ed. London: Pharmaceutical Press. 2009.

SASANI, F., JAVANBAKHT, J., SAMANI, R., SHIRANI, D. Canine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v.40, n.1, p. 57-60, 2016.

SAVJANI, K.T., GAJJAR, A.K., SAVJANI, J.K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN Pharmaceuticals**, v. 2012, 10 p., 2012.

SCARPIGNATO, C. Piroxicam- $\beta$ -Ciclodextrin: A GI Safer Piroxicam. **Current Medicinal Chemistry**, v.20, p.2415-2437, 2013.

SINGH, R., BHARTI, N., MADAN, J., HIREMATH, N. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.2, n.3, p.171-183, 2010.

SINHA, V.R., ANITHA, R., GHOSH, S., NANDA, A., KUMRIA, R. Complexation of Celecoxib with  $\beta$ -ciclodextrin: Characterization of the interaction in Solution and in Solid state. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.94, n.3, p.676-687, 2005.

SOBRINHO, J.L.S., SOARES, M.F.L.R. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Química Nova**, v.34, n.9, p.1534-1538, 2011.

SONGKRO, S., HAYOOK, N., JAISAWANG, J., MANEENUAN, D., CHUCHOME, T., KAEWNOPPARAT, N. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repelente. **Journal of inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.72, p.339-355, 2012.

SWEETMAN, S. **Martindale: The Complete Drug Reference**. London: Pharmaceutical Press. 36<sup>a</sup> ed, Thomson Micromedex, Greenwood, Colorado, USA, 2009.

TAKAHASHI, A.I., VEIGA, F.B., FERRAZ, H.G. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization - Part I: phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.12, n.1,p.1-6, 2012a.

TAKAHASHI, A.I., VEIGA, F.B., FERRAZ, H.G. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization - Part II: X-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.12, n.1, p. 8-15, 2012b.

TAKAHASHI, A.I., VEIGA, F.B., FERRAZ, H.G. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization - Part III. Differential scanning calorimetry and thermogravimetry. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.12, n.1, p.16-20, 2012c.

TEMPONE, A.G., MORTARA, A.H.H., REIMÃO, J.Q. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.36, n.2, p.159-163, 2010.

USP – NF. United State Pharmacopoeia 29 – National Formulary 34. V III. 2011.

VAJNA, B., FARKAS, I., FARKAS, A., PATAKI, H., NAGY, Z., MADARÁSZ, J., MAROSI, G. Characterization of drug-cyclodextrin formulations using Raman mapping and multivariate curve resolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, p.38-44, 2011.

VEIGA, F. J. B., PECORELLI, C. C. M. F., RIBEIRO, S. S. L. **As ciclodextrinas e a tecnologia farmacêutica**, 1.ed, 228 p., 2006.

VLACHOU, M., PAPAIOANNOU, G. Preparation and Characterization of the Inclusion Complex of Furosemide with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. **Journal of Biomaterials Applications**, v.17, n.3, p. 197–206, 2003.

VOGT, F.G., STROHMEIER, M. 2D solid-state NMR analysis of inclusion in drug-cyclodextrin complexes. **Molecular pharmaceuticals**, v.9, n.11, p.3357-3374, 2012.

WAGH, M.P., PATEL, J.S. Biopharmaceutical classification system: scientific basis for biowaiver extensions. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, p. 12-19, 2010.

WEN, J., LIU, B., YUAN, E., MA, Y., ZHU, Y., Preparation and physicochemical properties of the complex of naringenin with hydroxypropil-beta-cyclodextrin. **Molecules**, v.15, n.6, p.4401-4407, 2010.

WILLIAMS, H.D., TREVASKIS, N.L., CHARMAN, S.A., SHANKER, R.M., CHARMAN, W.N., POUTON, C.W., PORTER, C.J. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. **Pharmacological Reviews**, v.65, n.1, p.315-499, 2013.

YANG, Y., GAO, J., MA, X., HUANG, G. Inclusion complex of tamibarotene with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p.1-6, 2016.

ZHANG, L., LIU, M., LU, C., REN, D., FAN, G., LIU, C., LIU, M., SHU, G., PENG, G., YUAN, Z., ZHONG, Z., ZHANG, W., FU, H. The hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation of toltrazuril for enhancing bioavailability. **Drug Designer, Development and Therapy**, v.12, p. 583-589, 2018.

ZHANG, L., ZHU, W., SONG, L., WANG, Y., JIANG, H., XIAN, S., REN, Y. Effects of Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin on *in Vitro* Insulin Stability. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.5, p.2031-2040, 2009.

ZHENG, X., WU, F., HONG, Y., SHEN, L., LIN, X., FENG, Y. Developments in taste-masking techniques for traditional Chinese medicines. **Pharmaceutics**, v.10, p.157-179, 2018.

## CAPÍTULO 1

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE FURAZOLIDONA BASEADOS EM CICLODEXTRINAS POR ANÁLISES TÉRMICAS, MEV, DRX, ESPECTROSCOPIA RAMAN E RMN <sup>13</sup>C NO ESTADO SÓLIDO E, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*<sup>1</sup>**

**STUDY OF FURAZOLIDONE-BASED CYCLODEXTRINS COMPLEXES BY THERMAL ANALYSIS, SEM, DRX, RAMAN SPECTROSCOPY AND <sup>13</sup>C NMR IN THE SOLID STATE AND BIOLOGICAL *IN VITRO* EVALUATION**

Artigo a ser submetido à publicação ao periódico Carbohydrate Polymers.

Suzana Gonçalves Carvalho<sup>a</sup>; Daniel Fernandes Cipriano<sup>b</sup>; Jair Carlos Checon de Freitas<sup>b</sup>; Miguel Ângelo Schettino Junior<sup>b</sup>; Enrique Ronald Yapuchura Ocaris<sup>b</sup>; Carolina Bioni Garcia Teles<sup>c</sup>; Marcos Santos Zanini<sup>a</sup>; Janaína Cecília Oliveira Villanova<sup>a,d</sup>

---

<sup>1</sup>Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, do primeiro autor.

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e de Engenharia – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, s/n. Centro, Alegre-ES. CEP: 29500-00, Caixa Postal 16. Email: suzana2994@gmail.com

<sup>b</sup>Departamento de Física, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Av. Fernando Ferrari, nº 514 – Goiabeiras - CEP: 29.075-910 - Vitória/ES

<sup>c</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Rua da Beira, nº 7671- Lagoa - CEP: 76.812-245 - Porto Velho/RO.

<sup>d</sup>Laboratório de Produção Farmacêutica, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, s/n. Centro, Alegre-ES. CEP: 29500-00, Caixa Postal 16.



1 **ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE FURAZOLIDONA BASEADOS EM**  
2 **CICLODEXTRINAS POR ANÁLISES TÉRMICAS, MEV, DRX, ESPECTROSCOPIA**  
3 **RAMAN E RMN <sup>13</sup>C NO ESTADO SÓLIDO E, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*<sup>1</sup>**  
4

5 Suzana Gonçalves Carvalho<sup>a</sup>, Daniel Fernandes Cipriano<sup>b</sup>, Jair Carlos Checon de  
6 Freitas<sup>b</sup>, Miguel Ângelo Schettino Junior<sup>b</sup>, Enrique Ronald Yapuchura Ocaris<sup>b</sup>,  
7 Carolina Bioni Garcia Teles<sup>c</sup>, Marcos Santos Zanini<sup>a</sup>, Janaína Cecília Oliveira  
8 Villanova<sup>a,d\*</sup>

9  
10 <sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias  
11 e de Engenharia – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto  
12 Universitário, s/n. Centro, Alegre-ES. CEP: 29500-00, Caixa Postal 16.

13 <sup>b</sup>Departamento de Física, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Av.  
14 Fernando Ferrari, nº 514 – Goiabeiras - CEP: 29.075-910 - Vitória/ES

15 <sup>c</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Rua da Beira, nº 7671- Lagoa - CEP: 76.812-245 - Porto  
16 Velho/RO.

17 <sup>d</sup>Laboratório de Produção Farmacêutica, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da  
18 Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário,  
19 s/n. Centro, Alegre-ES. CEP: 29500-00, Caixa Postal 16.

20  
21 **Correspondência:** J.C.O. Villanova, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
22 Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e de Engenharia – CCAE, Universidade  
23 Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, s/n, Caixa Postal 16, 29500-000,  
24 Alegre, Espírito Santo, Brazil. Tel: +55283552-8684. E-mail:  
25 pharmacotecnica@yahoo.com.br

26  
27 **Declaração de interesses:** os autores declaram que não há conflitos de interesse na  
28 execução do presente trabalho.

29  
30 **Financiamento:** o presente estudo recebeu apoio financeiro do Fundo de Amparo à  
31 Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (FAP/UFES/2015).

32  
33 **Abreviaturas:** β-CD: β-ciclodextrina; HP-β-CD: hidroxipropil-β-ciclodextrina; FZD:  
34 furazolidona; MFBFZD1:1: mistura física furazolidona:β-ciclodextrina (1:1);

35 MFBFZD1:2: mistura física furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina (1:2); MFHFZD1:1: mistura  
36 física furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1); MFHFZD1:2: mistura física  
37 furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:2); MBFZD1:1: malaxagem  
38 furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina (1:1); MBFZD1:2: malaxagem furazolidona: $\beta$ -  
39 ciclodextrina (1:2); MHFZD1:1: malaxagem furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina  
40 (1:1); MHFZD1:2: malaxagem furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; LBFZD1:1:  
41 liofilização furazolidona: $\beta$ -ciclodextrina (1:1); LBFZD1:2: liofilização furazolidona: $\beta$ -  
42 ciclodextrina (1:2); LHFZD1:1: liofilização furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina  
43 (1:1); LHFZD1:2: liofilização furazolidona:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:2).

44

45 **Resumo:** A formação de complexos de inclusão entre a furazolidona e ciclodextrinas  
46 desperta o interesse das áreas farmacêuticas e veterinária pela possibilidade do  
47 desenvolvimento de medicamentos para a farmacoterapia de leishmanioses em cães.  
48 No presente estudo, os complexos de inclusão foram preparados pelos métodos de  
49 malaxagem e liofilização, utilizando a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -  
50 ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), nas razões molares 1:1 e 1:2. Para avaliar o sucesso da  
51 complexação foram empregadas técnicas de análises térmicas (DSC e TG/DTG) e  
52 métodos para determinação da alteração da cristalinidade nos compostos:  
53 microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), espectroscopia  
54 RAMAN e ressonância magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$  RMN) no estado sólido.  
55 Após avaliação do sucesso da complexação, a inibição de crescimento de 50% ( $\text{IC}_{50}$ )  
56 das formas promastigotas e a citotoxicidade sobre macrófagos THP-1, no período de  
57 72 h, foram pesquisadas. A ocorrência de interações foi constatada para todos os  
58 produtos. A presença de amorfização nos produtos preparados a partir da  $\beta$ -CD na  
59 razão molar 1:2 por liofilização (LBFZD1:2) e da HP- $\beta$ -CD na razão molar 1:2 por  
60 liofilização (LBFZD1:2), foi confirmada por DSC, TG/DTG, MEV, DRX e  
61 espectroscopia Raman e RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido. Todas as amostras  
62 apresentaram atividade leishmanicida e se mostraram não tóxicas para macrófagos  
63 THP-1. Os valores do  $\text{IC}_{50}$  para os complexos MHFZD1:2 e LHFZD1:2 foram 2,7 e  
64 3,02  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, sendo ambos considerados promissores para o  
65 desenvolvimento de medicamentos de uso veterinário com vistas ao uso no  
66 tratamento de leishmanioses em cães.

67 **Palavras-chave:**  $\beta$ -ciclodextrina; 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina; sólidos amorfos;  
68 atividade leishmanicida.

69

## 70 1. INTRODUÇÃO

71

72 A leishmaniose cutânea canina (LCC) é um problema veterinário significativo  
73 em todo o mundo. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e, os  
74 animais infectados atuam como reservatórios dos parasitos, contribuindo para a  
75 transmissão da doença para os humanos (Sasani et al., 2016). A LCC é considerada  
76 uma doença negligenciada, principalmente porque a maioria dos casos ocorre longe  
77 dos serviços veterinários e devido à falta de novos fármacos e novas formas  
78 farmacêuticas para uso exclusivo na farmacoterapia veterinária da doença (Passos et  
79 al., 2014; Sasani et al., 2016; Singh et al., 2010).

80 O uso da furazolidona (FZD) no tratamento da leishmaniose tem sido descrito  
81 por diversos autores que testaram a atividade leishmanicida do fármaco puro,  
82 associado ou incorporado em lipossomas, sobre formas promastigotas e amastigotas  
83 de diferentes cepas de *Leishmania*, tais como *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L.*  
84 *braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis* (Berman, & Lee, 1983; Neal et al., 1988;  
85 Reimão et al., 2010; Tempone et al., 2010; Carvalho et al., 2018). Passos e  
86 colaboradores (2014) relataram, durante o tratamento de 8 cães infectados por *L.*  
87 *braziliensis* com uma associação entre furazolidona (35 mg/kg/dia) e domperidona (1  
88 mg/kg/12h), que a terapêutica foi efetiva para o tratamento das lesões, que foram re-  
89 epitalizadas em 93 dias. No entanto, os autores observaram que o tratamento com a  
90 FZD causou reações adversas nos animais, como anorexia, perda de peso, fadiga e  
91 perda da coordenação motora, que podem estar relacionadas à dose elevada do  
92 fármaco (Alam et al., 2016). Assim, aprimorar a solubilidade da FZD através da  
93 formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas de interesse farmacêutico é  
94 uma estratégia farmacotécnica que pode aumentar a taxa de dissolução e incrementar  
95 sua biodisponibilidade, reduzindo a toxicidade do fármaco, mediante a possibilidade  
96 de administração de doses menores. Além disso, o aumento da solubilidade visa  
97 favorecer a preparação de formas farmacêuticas orais líquidas, o que pode aumentar  
98 a adesão dos animais ao tratamento (Corrêa et al., 2005; Lyra et al., 2012; Jambhekar,  
99 & Breen, 2016).

100           Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos de unidades  $\alpha$ -  
101 D-glicopirranose, produzidas durante o processo de degradação do amido (Brewster,  
102 & Loftsson, 2007). Cada unidade de  $\alpha$ -D-glicopirranose possui 3 grupos hidroxila (OH)  
103 livres posicionados na superfície da estrutura, o que favorece a interação com a água  
104 mediante a formação de ligação de hidrogênio. Por outro lado, o interior da cavidade  
105 é delimitado pelo alinhamento dos hidrogênios e pelo oxigênio da ligação éter das  
106 cadeias carbônicas, o que lhe confere caráter hidrofóbico e favorece interações fracas  
107 do tipo van der Waals e dipolo-dipolo. Tal distribuição confere às CDs uma  
108 característica anfifílica, peculiaridade que a torna útil no preparo de complexos de  
109 inclusão com fármacos de alta lipossolubilidade (Loftsson et al., 2005; Brewster, &  
110 Loftsson, 2007).

111           Entre as inúmeras CDs de interesse disponíveis comercialmente, se destacam  
112 a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). A  $\beta$ -CD é uma CD  
113 natural que possui sete unidades de glicopirranose, sendo a mais estudada e mais  
114 utilizada na preparação de medicamentos baseados em complexos de inclusão  
115 comercialmente disponíveis (Martin Del Valle, 2004). Sua monografia está inscrita no  
116 *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009) juntamente com as demais CDs  
117 naturais. A  $\beta$ -CD possui massa molar de 1135 g/mol e solubilidade em água de 18,5  
118 mg/mL, a 25 °C. Além da origem natural da  $\beta$ -CD, as principais vantagens associadas  
119 ao seu uso são o diâmetro e o volume da cavidade hidrofóbica (6,0 a 6,5 Å e 262 Å,  
120 respectivamente), o que lhe confere boa capacidade de inclusão; a baixa toxicidade  
121 relatada, relacionada ao seu uso; e, o menor preço quando comparado ao das demais  
122 ciclodextrinas (Jambhekar, & Breen, 2016). Já a HP- $\beta$ -CD é uma CD sintética, obtida  
123 por modificação química da  $\beta$ -CD, mediante substituição do H pelo grupo -  
124 CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>. A HP- $\beta$ -CD possui massa molar de 1400 g/mol e apresenta maior  
125 solubilidade em água que a  $\beta$ -CD (> 600 mg/mL, a 25 °C), sendo esta a principal  
126 vantagem associada ao seu uso (Jambhekar, & Breen, 2016). Estudos apontam que  
127 a HP- $\beta$ -CD possui baixa toxicidade e é bem tolerado em animais (Gould, & Scott,  
128 2005). A estrutura química geral das CDs utilizadas no presente trabalho é dada na  
129 Figura 1.

130           De acordo com Takahashi, Veiga e Ferraz (2012a), várias técnicas analíticas  
131 são necessárias para caracterizar os ICs, sendo os métodos complementares entre  
132 si. No presente trabalho foram escolhidas aquelas baseadas na modificação das

133 propriedades térmicas e na cristalinidade dos compostos formados, a saber: MEV,  
 134 DSC, TG/DTG, DRX, RMN de carbono no estado sólido e espectrometria RAMAN.

135

136

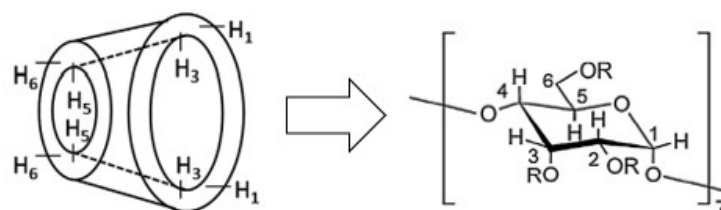
137

138

139

140

141



$\beta$ -CD      R = H

HP-  $\beta$ -CD    R = CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>

142 **Figura 1.** Estrutura química das CDs utilizadas no presente estudo (Adaptado de  
 143 Ferreira et al., 2015).

144

145

146

147

148

149

150

151

As termoanálises envolvem um grupo de técnicas nas quais uma ou mais propriedades físicas de dado material podem ser medidas em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura. As técnicas termoanalíticas mais empregadas para estudar a complexação com ciclodextrinas são a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG/DTG) (Giordano, Novak, & Moyano, 2001; Singh et al., 2010; Takahashi, Veiga e Ferraz, 2012a).

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

Métodos baseados na modificação da cristalinidade dos compostos se mostram úteis para a comprovação da formação de complexos. Moléculas que apresentam diferentes formas cristalinas possuem, também, diferentes propriedades físico-químicas, entres elas, a solubilidade com consequente modificação da biodisponibilidade (Aguiar et al., 1999). Informações estruturais sobre CIs podem ser obtidas, principalmente, a partir de análises combinadas dos métodos de DRX, espectroscopia RAMAN e técnicas de RMN de <sup>13</sup>C no estado sólido. Genericamente, tais métodos provêm informações acerca da organização molecular à curta distância das moléculas hóspede e hospedeira, a partir da determinação das diferenças existentes nos desvios químicos e modificações dos compostos livres comparados com os complexos. A diminuição da cristalinidade do material e amorfização dos compostos é um forte indício de sucesso da complexação (Günter, 1994; Pessine, Calderine & Alexandrino, 2012; Songkro et al., 2012; Vogt, & Strohmeier, 2012).

165 Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o sucesso da  
166 complexação da furazolidona com ciclodextrinas de interesse farmacêutico,  
167 nomeadamente, a  $\beta$ -CD e a HP- $\beta$ -CD, utilizadas com o intuito de aumentar a  
168 solubilidade do fármaco, melhorar sua biodisponibilidade e reduzir a dose a ser  
169 administrada, com consequente diminuição da toxicidade. Para tal, foram utilizados  
170 métodos baseados em análises térmicas (calorimetria exploratória diferencial e  
171 termogravimetria) e técnicas capazes de estudar alterações de cristalinidade nos  
172 complexos, como a difração de raios X, a ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  no  
173 estado sólido e a espectroscopia RAMAN. Os métodos que avaliam alterações na  
174 cristalinidade se mostram úteis para detectar a existência de alterações de sinais  
175 pertinentes nos complexos, quando comparados com aqueles observados nos  
176 difratogramas e nos espectros dos materiais de partida e das misturas físicas.  
177 Alterações na cristalinidade observadas nos compostos são, por sua vez, indicativos  
178 não somente do sucesso da complexação mas, também, da ocorrência da  
179 modificação das propriedades físico-químicas aparentes das moléculas hospedadas  
180 na cavidade das CDs. Substâncias que apresentam diferentes organizações de suas  
181 estruturas cristalinas possuem diferentes propriedades, dentre as quais, a solubilidade  
182 e a estabilidade (Aguiar et al., 1999). Finalmente, a citotoxicidade dos compostos em  
183 linhagens de macrófagos THP-1 e a atividade leishmanicida sobre formas  
184 promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foram pesquisadas empregando métodos  
185 *in vitro*.

186

## 187 2. MATERIAL E MÉTODOS

188

### 189 2.1 Material

190

191  $\beta$ -ciclodextrina ( massa molar média 1134,9 g/mol), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina  
192 (massa molar média 1460 g/mol), furazolidona (teor de 98%; massa molar média  
193 225,16 g/mol) e, os reagentes L-glutamina, sal de tetrazólio (MTT), solução de  
194 dextrose, hipoxantina, dimetilsulfóxido, tampão HEPES, solução tampão fosfato salino  
195 (PBS), forbol-12-miristato13-acetato (PMA), meio RPMI, bicarbonato de sódio,

196 eritrosina B e resazurina, foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (EUA). Soro  
197 fetal bovino (SFB) foi comprado da empresa Gibco (EUA). A gentamicina, a  
198 pentamidina e a eritrosina B procederam das empresas Schering-Plough, Sanofi-  
199 Aventis e Inlab, Brasil. Todos os reagentes empregados foram da mais alta pureza e  
200 adquiridos comercialmente.

201

## 202 **2.2 Obtenção dos complexos**

203

204 Os complexos foram preparados pelos métodos de malaxagem e liofilização,  
205 empregando furazolidona (225,6 mg),  $\beta$ -CD (1135 ou 2270 mg) e HP- $\beta$ -CD (1460 ou  
206 2920 mg), nas razões molares 1:1 e 1:2 (fármaco:CD). Pela técnica de malaxagem,  
207 uma solução aquosa de etanol a 75 %v/v foi adicionada lentamente sobre as misturas  
208 FZD:CDs, até a obtenção de uma massa pastosa, que foi mantida sob agitação  
209 magnética (FISATOM, modelo 752A, Brasil) durante seis horas. Um pequeno volume  
210 de solução hidroalcoólica foi adicionado ocasionalmente, mantendo a mistura com  
211 consistência pastosa, passível de ser malaxada. Os produtos obtidos foram secos em  
212 temperatura ambiente. Na liofilização, as CDs foram inicialmente solubilizadas em  
213 solução aquosa de etanol a 75 %v/v e, à esta solução, a FZD foi adicionada. As  
214 misturas foram mantidas sob agitação em banho recíprocante (MARCONI, modelo  
215 M93A, Brasil) a 35° C, durante o período de 48 horas. A suspensão assim obtida foi  
216 congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 97 horas, sob pressão de 79  $\mu$ Hg a -  
217 56°C (LIOTOP, modelo 100L, Brasil). Misturas físicas entre a FZD e as CDs foram  
218 preparadas, nas mesmas razões molares, por mistura simples, empregando gral e  
219 pistilo.

220

## 221 **2.3 Microscopia eletrônica de varredura**

222

223 A morfologia das partículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura  
224 (MEV) em microscópio JEOL (modelo JSM-6010LV, EUA). O material foi metalizado  
225 com ouro (20 mPA, 120s), em metalizador DESK V (modelo Denton Vacuum).  
226 Fotomicrografias foram obtidas com tensão de excitação de 20 keV, em diferentes  
227 ampliações.

228

229

## 2.4 Análise térmica

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

## 2.5 Difração de raio X

240

241

242

243

244

245

246

247

## 2.6 Espectroscopia Raman

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

## 2.6 RMN de <sup>13</sup>C no estado sólido

Para avaliar os eventos térmicos ocorridos nos materiais, curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas utilizando calorímetro SHIMADZU (modelo TGA50, Japão), em atmosfera de argônio, com razão de fluxo de 50 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min, entre 25 e 300 °C. Termogramas TG/DTG foram obtidos em termobalança SHIMADZU (modelo TGA50, Japão), em atmosfera de nitrogênio, razão de fluxo de 50 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C/min, entre 25 e 800 °C.

Os difratogramas de raios X foram obtidos em difratômetro SHIMADZU (modelo XRD-6000, Japão), empregando radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), em faixa de 20° a 60°, com degraus de 0,02° a 2°/min. As análises foram feitas nos materiais de partida, nas misturas físicas e nos complexos. Os difratogramas foram obtidos por meio do programa Origin® 9.1.

Espectros Raman das amostras foram registados em condições ambientais empregando microscópio confocal (WITec, modelo Alpha 300, Alemanha), utilizando laser de cristal verde bombeado por diodo polarizado linear, com feixe de excitação em comprimento de onda nominal de 532 nm (2,33 eV). As análises foram feitas com microscópio acoplado, com feixe de laser refletido por um divisor de feixe holográfico e focado na amostra com objetiva (ampliação: 20; abertura numérica: 0,40). A luz Raman retroespalhada foi detectada por um CCD espectroscópico retroiluminado a ar (Andor) por trás de um filtro de borda e espectrógrafo de grade (Acton). O tempo de integração de escolhido foi de 60 s à 1mW. Os espectros foram obtidos por meio do programa Origin® 9.1.



261

262 Os experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram conduzidos em temperatura ambiente  
263 em um espectrômetro Varian-Agilent 400 MHz, operando em frequências de 399,73  
264 MHz para prótons e 100,52 MHz para  $^{13}\text{C}$ , o que corresponde a um campo magnético  
265 de 9,4 T. Utilizou-se uma sonda de radiofrequência (RF) de tripla ressonância com  
266 rotores de zircônia com 4 mm de diâmetro, apropriada para experimentos com CP e  
267 MAS em frequências de rotação de até 18 kHz. Como sinal de referência para os  
268 espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi utilizado o pico associado aos grupos metila no espectro  
269 do hexametilbenzeno (HMB), o qual possui deslocamento químico igual a 17,3 ppm  
270 em relação à referência primária para  $^{13}\text{C}$ , que é o pico único observado no espectro  
271 de RMN de  $^{13}\text{C}$  do tetrametilsilano (TMS) (Gil & Geraldês, 1987).

272 Foram realizados experimentos de CP/MAS com frequência de rotação em  
273 torno do ângulo mágico de 10 kHz, aplicação de pulso de 3,6  $\mu\text{s}$  nos núcleos de  $^1\text{H}$ ,  
274 intervalo de 5 s entre pulsos, tempo de contato de 10 ms, tempo de aquisição de 81,92  
275 ms, aquisição de 1500 transientes, janela espectral de 50 kHz e 8192 pontos. No  
276 processamento do FID, foi realizado uma apodização exponencial com  $l_b = 30$ . Os  
277 espectros foram obtidos por meio do programa Origin<sup>®</sup> 9.1.

278

## 279 **2.7 Avaliação biológica *in vitro***

280

281 Formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8) foram  
282 adquiridas da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), Rio de  
283 Janeiro (Brasil). Após descongelamento, os parasitos foram cultivados a 24°C em  
284 meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), solução tampão  
285 HEPES (25 mM), solução de dextrose (11,1 mM), solução de bicarbonato de sódio  
286  $\text{NaHCO}_3$  (23,8 mM), hipoxantina (0,37 mM), glutamina (2 mM) e gentamicina (40  
287  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para proliferação, uma alíquota de parasitos em fase estacionária foi diluída  
288 em 0,04% de eritrosina B e contada em câmara de Neubauer espelhada, em  
289 microscópio óptico (Olympus, modelo CX21, Brasil), com aumento de 400X. Em  
290 seguida, alíquotas de  $5 \times 10^5$  promastigotas/mL foram transferidas para meio RPMI  
291 suplementado com 10% de SFB e mantidos a 24 °C durante cinco dias, com  
292 sucessivas passagens de, até no máximo, doze. Parasitos em fases de crescimento  
293 exponencial foram utilizados em todos os experimentos.

294

### 295 **2.7.1 Atividade leishmanicida**

296

297 A atividade leishmanicida foi determinada pelo método da redução da  
298 resazurina, conforme descrito por Rolón e colaboradores (2006), após incubação das  
299 formas promastigotas de *L. amazonensis* com amostras do fármaco livre, CDs puras,  
300 misturas físicas e complexos, previamente dissolvidas em DMSO (concentração final  
301 de 0,6%, não tóxica para o parasito). Foram testadas concentrações entre 100 e 0,78  
302 µg/mL. 20,0 µL de cada diluição das amostras foram adicionados em cada poço da  
303 placa contendo um inóculo inicial de  $1,0 \times 10^6$  parasitos/mL, diluídos em 180,0 µL de  
304 meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. Como controle negativo foi utilizado  
305 *Leishmania* em meio RPMI 1640 suplementado; como controle positivo, o tratamento  
306 com a pentamidina (3,0 µg/mL); e, como branco, somente o meio RPMI 1640 puro. As  
307 placas foram incubadas a 24 °C, durante 72 horas, em estufa BOD. Decorrido este  
308 período, foram adicionados aos poços 20,0 µL de resazurina a 2,0 mM em tampão  
309 PBS, e as placas foram novamente incubadas por 5 horas, à mesma temperatura.  
310 Finalizada a incubação, a fluorescência foi determinada com auxílio de  
311 espectrofotômetro Synergy HT (BioTek, USA) com emissão e extinção de 530 e 590  
312 nm, respectivamente. Os valores foram processados pelo programa Gen5® 5.11. Os  
313 ensaios foram realizados em triplicata. A inibição do crescimento (IC) foi calculada  
314 pela Equação:

315

$$316 \quad IC_{50} = 100 - \frac{(Fluorescência\ da\ Amostra - Fluorescência\ do\ Branco)}{(Fluorescência\ do\ Controle\ negativo - Fluorescência\ do\ Branco)} \times 100 \quad (1)$$

317 A concentração capaz de inibir o crescimento no mínimo de 50% das  
318 promastigotas (IC<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão linear, utilizando o  
319 programa Origin® 9.1. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média.

320

### 321 **2.7.2 Diferenciação de células THP-1**

322

323 A diferenciação celular seguiu protocolo descrito por Jain e colaboradores  
324 (2012). Células THP-1 foram mantidos em meio RPMI 164 acrescido de 10% de SFB,

325 na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/poço. Para a diferenciação da linhagem THP-1  
326 em macrófagos aderentes, foram adicionados aos poços, 25,0 ng/mL de forbol-12-  
327 miristato13-acetato (PMA) e as placas foram incubadas, por 12 horas, em atmosfera  
328 com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, a 37 °C. As células não aderidas foram removidas  
329 por lavagem com meio RPMI-1640.

330

### 331 **2.7.3 Ensaio de citotoxicidade**

332

333 A viabilidade dos macrófagos THP-1 foi avaliada pelo do método colorimétrico  
334 do MTT, utilizando o reagente Alamar Blue<sup>®</sup>, como descrito por (Mosmann, 1983).  
335 Após a lavagem foram adicionadas sob as células as amostras estudadas, em  
336 concentrações entre 7,0 µg/mL e 450,0 µg/mL. As placas foram incubadas por 72  
337 horas em estufa, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, a 37 °C. Ao fim  
338 deste período, foram adicionados em cada poço, 20,0 µL de MTT e as placas forma  
339 novamente incubadas por 4 horas, sob as mesmas condições. Decorrido o tempo, o  
340 sobrenadante foi retirado e 100,0 µL de DMSO foi adicionado em cada poço, para  
341 solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em leitor  
342 de ELISA (Biochrom, modelo Asys Expert Plus, EUA), em comprimento de onda de  
343 570 nm. A concentração citotóxica para cada amostra foi determinada por meio da  
344 Equação 2. O valor da concentração citotóxica para a perda de viabilidade em no  
345 máximo 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão linear,  
346 utilizando o programa Origin<sup>®</sup> 9.1. Células sem tratamento e células tratadas com  
347 tampão de lise foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente.  
348 Meio RPMI 1640 puro foi empregado como branco. Os ensaios foram realizados em  
349 triplicata. A partir desses resultados de CC<sub>50</sub>, foi determinado o índice de seletividade  
350 (IS), demonstrado na Equação 3.

351

$$352 \quad CC_{50} = \frac{(Absorbância da Amostra - Absorbância do Branco)}{(Absorbância do Controle negativo - Absorbância do Branco)} \times 100 \quad (2)$$

353

$$Índice de seletividade = \frac{CC_{50}}{IC_{50}} \quad (3)$$

354

### 355 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

356

#### 357 3.1 Preparo dos complexos

358

359 Conforme Veiga, Pecorelli e Ribeiro (2006), as relações estequiométricas mais  
360 usuais para a formação de complexos são 1:1 e 1:2. Apesar do relato de trabalhos  
361 que empregam outras razões molares fármaco:CD (1:3, 1:4, 2:1, entre outros) é  
362 importante destacar que sempre deve ser utilizada a menor concentração possível de  
363 CDs, uma vez que o requerimento de proporções maiores da molécula hóspede  
364 denota menor eficiência de complexação e inviabiliza o preparo de qualquer forma  
365 farmacêutica, já que o volume de matéria-prima a ser utilizado será elevado  
366 (Jambhekar, & Breen, 2016). Tais observações justificam o interesse no preparo de  
367 ICs nas razões 1:1 e 1:2. Ainda, segundo os mesmos autores, as moléculas hóspedes  
368 a serem complexadas devem possuir massa molar compreendida entre 100 e 400  
369 Daltons. Uma vez que a massa molar da FZD é de 225,16 g/mol e que sua solubilidade  
370 em água é baixa (40 mg/L), o fármaco se mostra como um bom candidato para a  
371 complexação.

372 Existem inúmeros trabalhos na literatura que relataram a preparação de CIs  
373 baseados em fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, inclusive,  
374 leishmanioses, com objetivos diversos, entre os quais, aumentar a solubilidade dos  
375 fármacos, incrementar a taxa de dissolução, melhorar a biodisponibilidade, reduzir a  
376 toxicidade e, viabilizar o preparo de soluções orais e parenterais, principalmente.  
377 Demicheli e colaboradores (2004) prepararam complexos de inclusão entre a  $\beta$ -CD e  
378 o antimoniato de meglumina (AntM) em diferentes proporções molares através do  
379 método de liofilização e estudaram a atividade leishmanicida dos complexos  
380 empregando animais infectados por *L. amazonensis*. Segundo os autores, os dados  
381 mostraram claramente a relação estabelecida entre a complexação e a melhor  
382 biodisponibilidade do AntM pela via oral. Frézard e colaboradores (2008) observaram  
383 que o complexo AntM: $\beta$ -CD preparado por liofilização foi capaz de atuar como um  
384 sistema de liberação sustentada do fármaco, sugerindo que essa propriedade do  
385 complexo pode resultar em uma mudança do local de absorção do fármaco no trato  
386 gastrointestinal. Lopes e colaboradores (2011) avaliaram a citotoxicidade e os efeitos  
387 tripanomicidas do complexo metronidazol: $\beta$ -CD contra formas amastigotas e

388 tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, mediante a realização de testes *in vitro*.  
389 Segundo os autores, o complexo e o fármaco puro exibiram a mesma atividade  
390 tripanomicida e toxicidade em células de mamíferos. No entanto, a complexação via  
391 inclusão aumentou a solubilidade do fármaco em água em 1,7 vezes. Sobrinho e  
392 Soares (2011) prepararam complexos de inclusão entre o benznidazol e a  $\beta$ -CD e  
393 perceberam o aumento da solubilidade e melhoria drástica na taxa de dissolução do  
394 fármaco após a formação dos CIs. Resultados semelhantes foram encontrados por  
395 Leonardi e colaboradores (2013). Belgamwar e colaboradores (2001) prepararam  
396 complexos de inclusão FZD: $\beta$ -CD usando o método de malaxagem na razão molar  
397 1:2 e alcançaram resultados promissores no aumento da solubilidade em água da  
398 FZD. Em um trabalho prévio, nosso grupo preparou complexos FZD: $\beta$ -CD na razão  
399 2:1 por malaxagem e liofilização e obteve resultados promissores, especialmente para  
400 os complexos obtidos por liofilização (Carvalho et al., 2018).

401

## 402 **3.2 Caracterização dos complexos**

403

### 404 **3.2.1 Análise térmica**

405

406 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG/DTG) são  
407 os métodos térmicos mais comumente empregados para avaliar a formação de  
408 complexos de inclusão com ciclodextrinas (Araújo et al., 2007; Lahiani-Skiba et al.,  
409 2007; Song & Xu, 2008; Singh et al., 2010; Takahashi, Veiga, & Ferraz, 2012b).

410 Pelo método de DSC, são analisadas a existência de alterações nos perfis  
411 termoanalíticos dos complexos quando comparados aos dos materiais de partida  
412 puros e das misturas físicas, com supressão de eventos tais como fusão e  
413 termodecomposição (Giordano, Novak, & Moyano, 2001; Takahashi, Veiga, & Ferraz,  
414 2012b). A análise das curvas DSC da  $\beta$ -CD e da HP- $\beta$ -CD permite observar a  
415 existência de endotermas relacionadas à saída da água livre da cavidade das  
416 moléculas hospedeiras em temperatura máxima de 123,9 °C e 99,6 °C,  
417 respectivamente. Tais achados estão em conformidade com a literatura (Giordano,  
418 Novak, & Moyano, 2001). Já a curva DSC da FZD livre apresenta uma única uma  
419 endoterma, em temperatura máxima de 260,4° C, relacionada à fusão do fármaco.  
420 Marian e colaboradores (2013), relataram a ocorrência de fusão da FZD em

421 temperatura de 258 °C, com o início da decomposição térmica em temperatura acima  
422 275° C. Os autores relataram ainda que a ausência de eventos relativos à perda de  
423 água na curva DSC do fármaco se deve à hidrofobicidade da molécula. As curvas de  
424 DSC podem ser vistas nas Figuras 2 e 3.

425 As curvas DSC das misturas físicas preparadas a partir da  $\beta$ -CD podem ser  
426 consideradas como originárias das contribuições dos materiais de partida, com a  
427 presença das endotermas de desidratação da CD e de fusão do fármaco, em  
428 temperaturas próximas às observadas para os materiais de partida. Nas curvas dos  
429 complexos preparados por malaxagem a partir da  $\beta$ -CD, os eventos relativos à  
430 desidratação não apresentaram grandes deslocamentos. Observação semelhante  
431 pode ser feita para o complexo FZD: $\beta$ -CD preparado por liofilização na razão molar  
432 1:1. Por outro lado, para o complexo FZD: $\beta$ -CD preparado por liofilização na razão  
433 molar 1:2, ambos os eventos térmicos se mostraram diferentes: ocorreu redução na  
434 temperatura na qual o evento de desidratação da CD ocorreu e a endoterma relativa  
435 à fusão da FZD não foi detectada. De acordo com a literatura, quando ocorre a  
436 inclusão da molécula ou de parte da molécula do fármaco na cavidade da CD de  
437 maneira efetiva, o hóspede estará protegido e sua temperatura de fusão se desloca  
438 para valores superiores aos originalmente observados ou este é suprimido (Giordano,  
439 Novak, & Moyano, 2001).

440

441

442

443

444

445

446

447

448

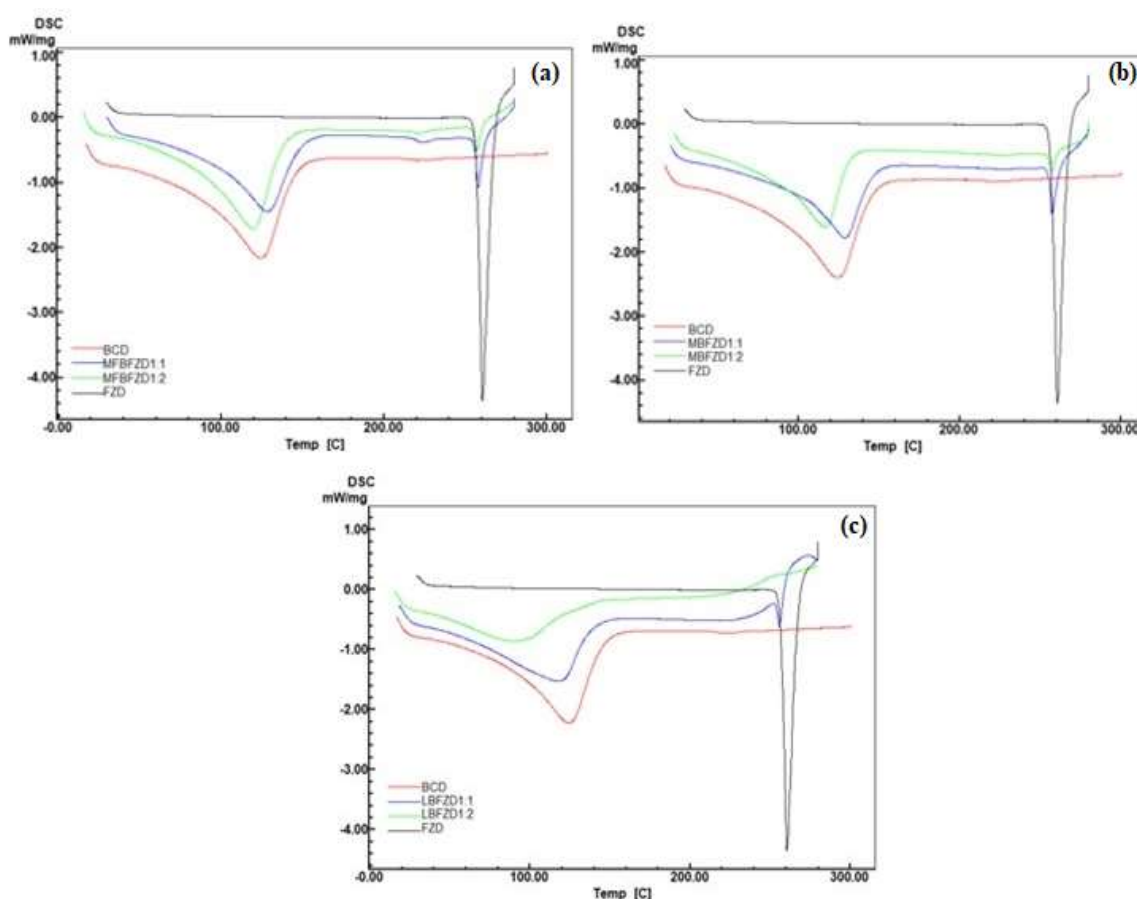
449

450

451

452

453



454

455 **Figura 2-** Curvas DSC em atmosfera de argônio (50 mL/min; 10 °C/min), obtidas entre  
456 25 e 300 °C para as amostras preparadas a partir da  $\beta$ -CD: (a) misturas físicas; (b)  
457 complexos obtidos por malaxagem; e, (c) complexos preparados por liofilização.

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

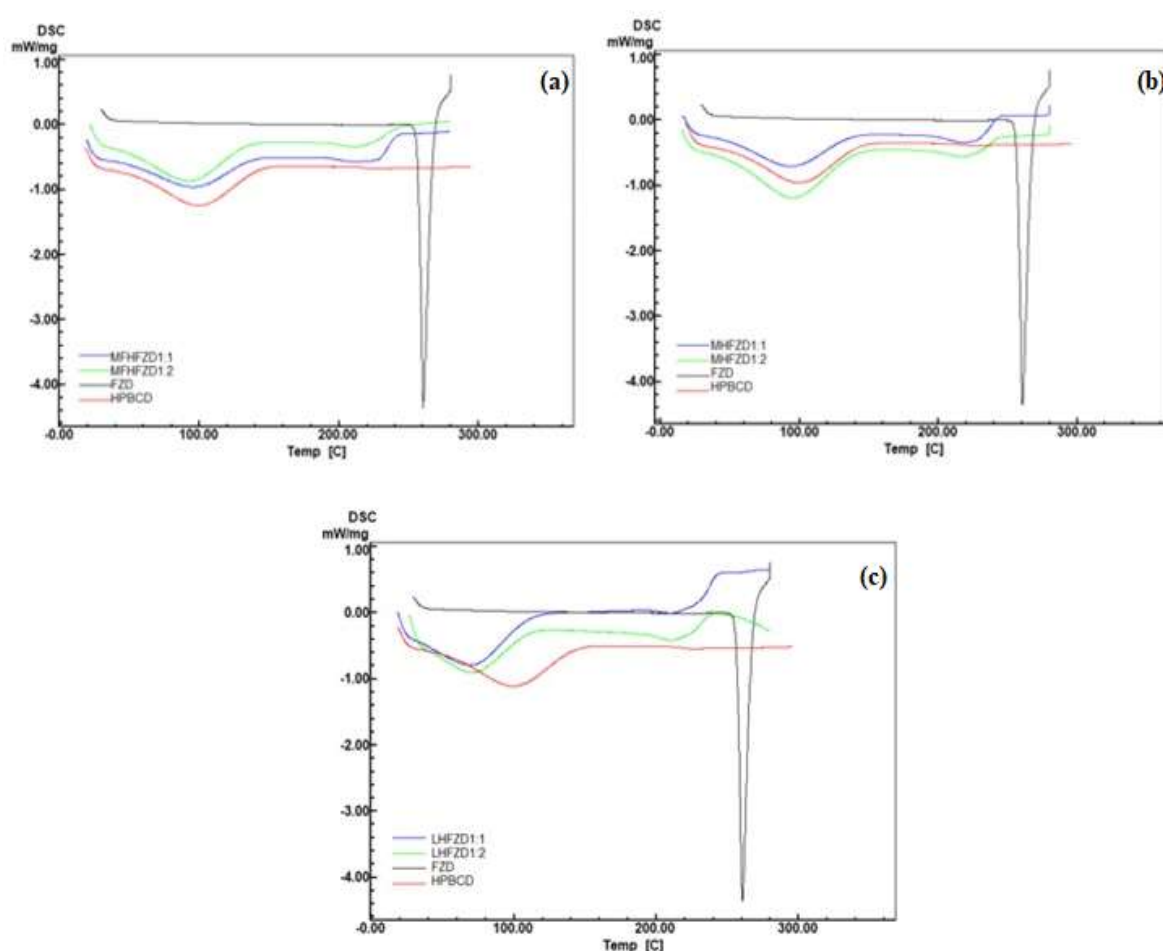
482

483

484

485

486



476 **Figura 3-** Curvas DSC em atmosfera de argônio (50 mL/min; 10 °C/min), obtidas entre  
477 25 e 300 °C para as amostras preparadas a partir da HP- $\beta$ -CD: (a) misturas físicas;  
478 (b) complexos obtidos por malaxagem; e, (c) complexos preparados por liofilização.

479

480

481

482

483

484

485

486

As curvas de DSC das misturas físicas obtidas a partir da HP- $\beta$ -CD em ambas as razões molares, apresentaram perfil semelhante àquelas observadas para a  $\beta$ -CD, podendo ser consideradas como sobreposições das curvas dos materiais de partida. Para os compostos FZD:HP- $\beta$ -CD preparados por malaxagem (1:1 e 1:2), ocorreu redução na temperatura relacionada ao evento de desidratação para todas as amostras, assim como para a temperatura de fusão do fármaco, deslocada para valores próximos à 210 °C. Tais achados sugerem a existência de interações entre as

487 moléculas. As maiores modificações foram vistas para os complexos FZD:HP- $\beta$ -CD  
 488 obtidos por liofilização: foram observadas reduções tanto nas temperaturas  
 489 relacionadas ao evento de perda de água quanto nos eventos relativos à fusão do  
 490 fármaco, confirmando sugerindo a formação dos complexos. Quando ocorre a  
 491 formação do complexo, espera-se que o pico de fusão do fármaco desapareça ou seja  
 492 deslocado para temperaturas superiores. No entanto, segundo alguns autores, pode-  
 493 se observar também, consoante o tipo de interações existentes entre as moléculas,  
 494 modificações nas temperaturas de fusão para valores inferiores ao observado para o  
 495 fármaco puro (Giordano, Novak, & Moyano, 2001). Na Tabela 1 são apresentados os  
 496 dados de energia envolvida nos eventos térmicos de DSC.

497

498 **Tabela 1-** Variação de entalpia ( $\Delta H$ ), temperatura inicial ( $T_{on}$ ), temperatura final ( $T_{end}$ )  
 499 e temperatura máxima ( $T_{peak}$ ) de ocorrência dos eventos térmicos observados por  
 500 DSC até 280° C, em atmosfera de argônio

501

	$\Delta H$ (J/g)	Temperatura (° C)			$\Delta H$ (J/g)	Temperatura (° C)		
	Perda de H <sub>2</sub> O	T <sub>on</sub>	T <sub>end</sub>	T <sub>peak</sub>	Fusão	T <sub>on</sub>	T <sub>end</sub>	T <sub>peak</sub>
<b>Materiais de partida</b>								
<b>FZD</b>	ND	ND	ND	ND	141,1	252,0	270,0	<b>260,4</b>
<b><math>\beta</math>-CD</b>	480,7	21,3	163,0	123,9	ND	ND	ND	ND
<b>HP-<math>\beta</math>-CD</b>	189,3	31,4	153,6	99,3	ND	ND	ND	ND
<b>Misturas físicas</b>								
<b>MFBFZD1 :1</b>	300,2	37,4	164,0	128,3	16,1	250,7	264,0	257,7
<b>MFBFZD1:2</b>	396,2	22,6	154,6	119,6	6,7	250,9	262,2	256,9
<b>MFHFZD1 :1</b>	132,2	36,5	147,6	95,5	7,9	191,4	231,4	211,3
<b>MFHFZD1:2</b>	185,0	29,9	142,4	91,6	8,0	191,8	228,4	210,9
<b>Complexos FZD:<math>\beta</math>-CD</b>								
<b>MBFZD1:1</b>	260,2	43,7	160,2	128,8	16,7	252,2	265,0	257,5
<b>MBFZD1:2</b>	279,8	31,7	142,3	116,8	5,3	251,1	261,0	257,1
<b>LBFZD1:1</b>	364,1	26,3	151,1	117,4	6,0	255,8	259,0	255,9
<b>LBFZD1:2</b>	213,9	24,8	143,0	<b>88,7</b>	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>Complexos FZD:HP-<math>\beta</math>-CD</b>								
<b>MHFZD1:1</b>	144,1	37,5	143,6	<b>93,1</b>	12,5	193,6	233,5	<b>217,4</b>



<b>MHFZD1:2</b>	180,0	31,0	146,2	<b>94,6</b>	11,7	193,8	234,0	<b>216,9</b>
<b>LHFZD1:1</b>	202,6	20,2	104,4	<b>68,4</b>	4,0	196,7	223,4	<b>209,7</b>
<b>LHFZD1:2</b>	167,6	30,3	112,4	<b>71,0</b>	7,0	193,3	224,2	<b>211,2</b>

502 ND: evento não detectado.

503 Por meio das análises termogravimétricas TG/DTG, dois parâmetros principais  
 504 que evidenciam a formação de complexos são observados. O primeiro é relativo à  
 505 alterações na porcentagem da massa inicial perdida pelos complexos quando  
 506 comparadas com as da CD pura e da MF, relacionada à perda de água, que ocorre  
 507 entre 90 e 150° C. Quando ocorre a complexação, a porcentagem de água perdida é  
 508 diminuída, sugerindo que a água foi deslocada do interior da cavidade para dar lugar  
 509 à molécula hóspede. O segundo, refere-se ao aumento da temperatura de degradação  
 510 observada para a molécula hóspede, pois, assume-se que a mesma estará protegida  
 511 da degradação quando complexada (Giordano, Novak, & Moyano, 2001; Takahashi,  
 512 Veiga, & Ferraz, 2012b).

513 As Figuras 4, 5 e 6 apresentam os termogramas dos materiais de partida e dos  
 514 CIs preparados a partir da  $\beta$ -CD e da HP-  $\beta$ -CD. Nos termogramas das matérias-  
 515 primas, picos referentes às endotermadas, bem definidos, podem ser visualizados.

516

517

518

519

520

521

522

523

524

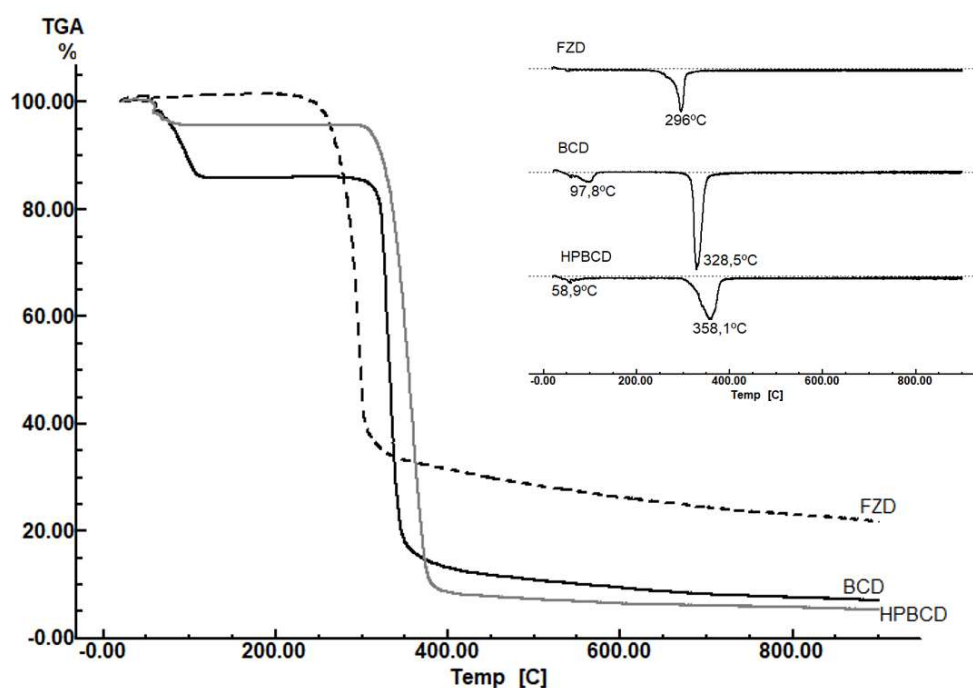
525

526

527

528

529



530 **Figura 4-** Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de  $N_2$  ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $10$   
 531  $^\circ\text{C/min}$ ), entre 25 e 800  $^\circ\text{C}$ , das amostras FZD,  $\beta$ -CD e HP-  $\beta$ -CD.

532

533 Para a FZD pura, nota-se a perda de, aproximadamente, 79% de massa  
 534 ( $T_{\text{máxima}} = 296 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) relacionada à decomposição térmica do fármaco. A ausência de  
 535 perda de massa em temperatura entre 25 a  $120^{\circ}\text{C}$  para a FZD pode ser explicada  
 536 pela natureza lipofílica do fármaco, que não possui água associada (Marian et al.,  
 537 2013). Para a  $\beta$ -CD pura, dois eventos térmicos podem ser observados no  
 538 termograma: o primeiro no intervalo de 25 a  $120^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{máxima}} = 97,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com perda  
 539 de massa de 13,9% relativa à desidratação da CD e, o segundo, em  $328,5^{\circ}\text{C}$ , com  
 540 perda de massa de 79,2%, atribuída à degradação térmica da CD com perda de  
 541 material carbonáceo. Nos termogramas da HP- $\beta$ -CD, é observada perda de massa  
 542 inicial de 4,8% ( $T_{\text{máxima}} = 58,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), atribuída à desidratação da CD. O evento  
 543 relacionado à termodecomposição da mesma pode ser visto à  $358,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , com perda  
 544 de 90,6%.

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

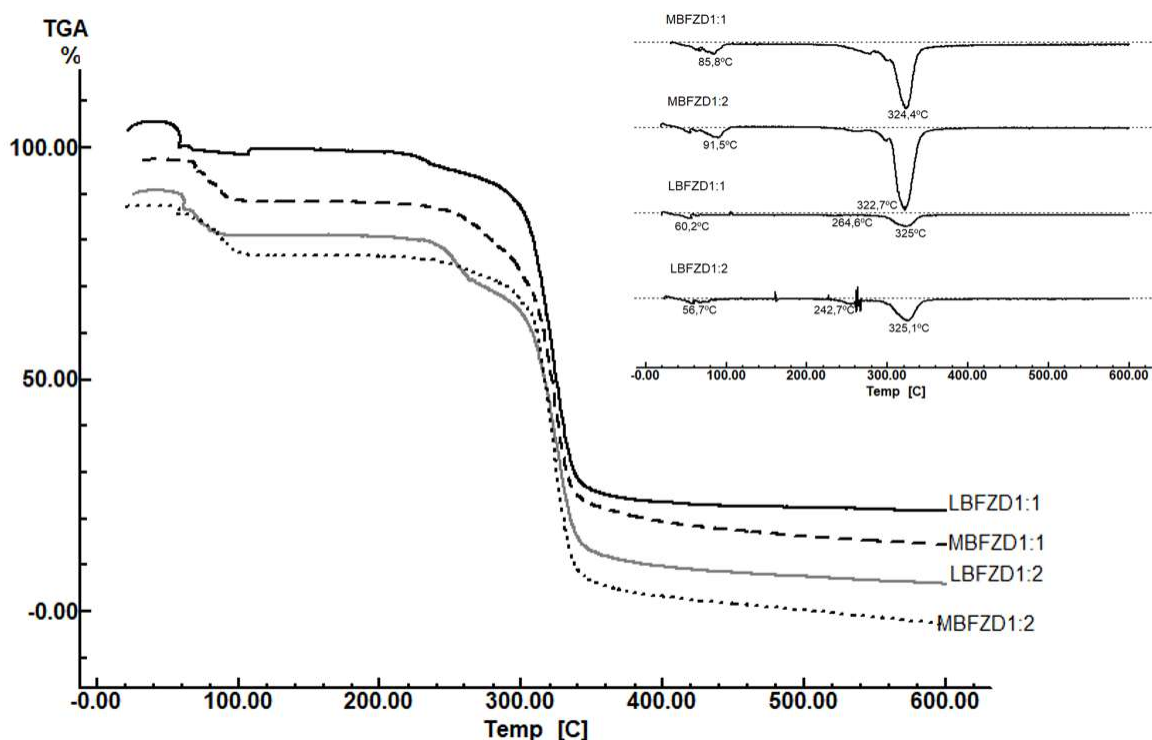
560

561

562

563

564



559

560 **Figura 5-** Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de  $\text{N}_2$  ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $10$   
 561  $^{\circ}\text{C/min}$ ), entre 25 e  $800^{\circ}\text{C}$ , das amostras preparadas a partir da  $\beta$ -CD.

562

563

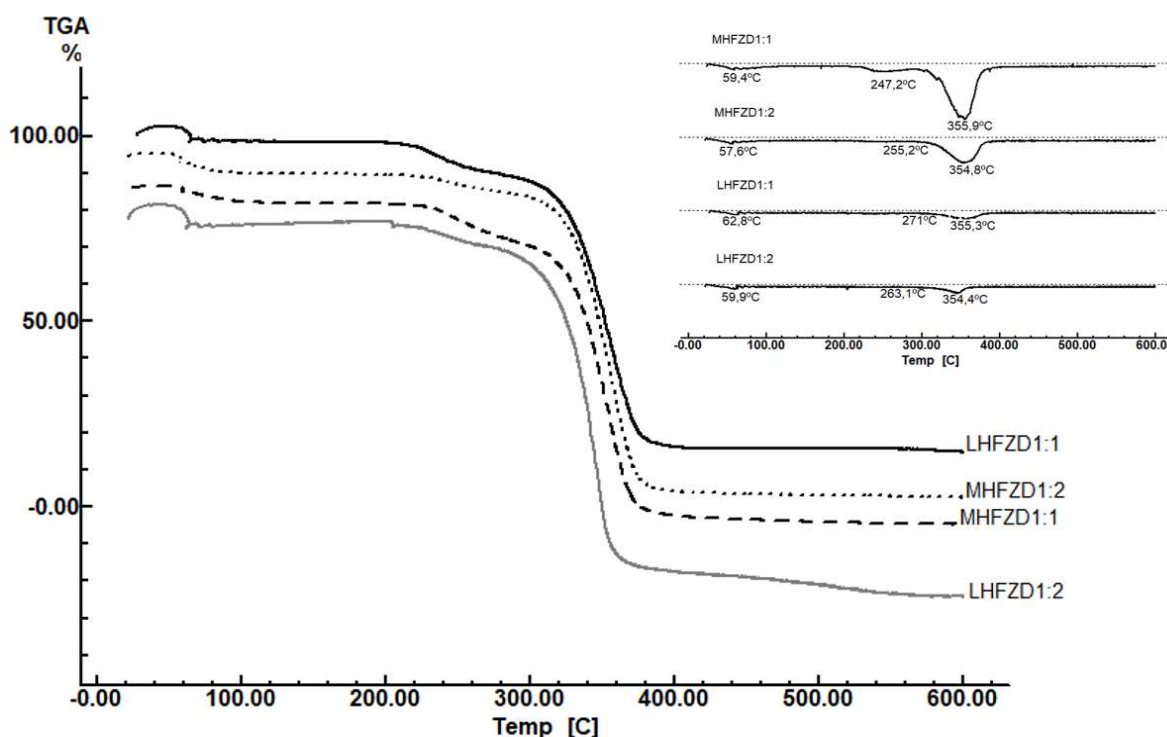
564

Para as misturas físicas FZD:β-CD, pequenas reduções nas perdas de massa podem ocorrer para as razões molares 1:1 (10,6%;  $T_{\text{máxima}} = 89,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e 1:2

565 (11,4%;  $T_{\text{máxima}} = 91,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Já os eventos de decomposição térmica foram  
 566 detectados em temperaturas próximas a  $325 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A Tabela 2 traz os resultados de  
 567 perda de massa (%) das amostras e as temperaturas aproximadas dos eventos são  
 568 mostradas entre parênteses.

569 Para os complexos preparados por malaxagem, nas razões molares 1:1 e 1:2,  
 570 a diminuição da massa relativa à perda de água foi de 8,9% ( $T_{\text{máxima}} = 85,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e  
 571 10,2% ( $T_{\text{máxima}} = 91,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente). Em temperatura próxima a  $320 \text{ }^{\circ}\text{C}$  pode  
 572 ser notado o acoplamento dos picos relacionados à fusão da FZD e da  $\beta$ -CD, com  
 573 perdas de massa de 74,2% ( $T_{\text{máxima}} = 325 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e 75% ( $T_{\text{máxima}} = 323 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  
 574 respectivamente. Por outro lado, para os complexos FZD: $\beta$ -CD obtidos por liofilização,  
 575 nas razões molares 1:1 e 1:2, além da menor perda de massa na primeira etapa (8,9%;  
 576  $T_{\text{máxima}} = 60,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e 5,7%;  $T_{\text{máxima}} = 66,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e temodecomposição da  $\beta$ -CD  $^{\circ}\text{C}$  em  
 577 temperatura próxima a  $325 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , outro evento térmico pode ser visualizado nos  
 578 termogramas, em temperatura próxima a 265 e  $243 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , com redução de massa de  
 579 11,8 e 10,0%, respectivamente. Este último evento pode estar relacionado à  
 580 temodecomposição do fármaco, que ocorreu em temperatura inferior a  $296 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , na  
 581 qual ocorreu a fusão do fármaco puro. Tais achados indicam a ocorrência de  
 582 interações entre o fármaco e a  $\beta$ -CD para os complexos preparados por liofilização,  
 583 especialmente para aquele preparado por liofilização, na razão molar 1:2 (LBFZD1:2),  
 584 o que está em conformidade com os achados na análise de DSC.

585  
 586  
 587  
 588  
 589  
 590  
 591  
 592  
 593  
 594  
 595  
 596  
 597



598

599

600 **Figura 6-** Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de N<sub>2</sub> (50 mL min<sup>-1</sup>; 10  
601 °C/min), entre 25 e 800 °C, dos produtos preparados a partir da HP-β-CD.

602 **Tabela 2.** Perda de peso (%) relativas às CDs, misturas físicas e complexos obtidas  
603 por termogravimetria. Temperaturas aproximadas de eventos são mostradas entre  
604 parênteses

605

<b>Perda de massa (%) (T<sub>máxima</sub> - °C)</b>			
	<b>Primeira etapa (25 – 120 °C)</b>	<b>Segunda etapa (120 – 270 °C)</b>	<b>Terceira etapa (&gt; 290 °C)</b>
<b>β-CD</b>	13,9 (97,8 °C)	ND	79,2 (328,5 °C)
<b>HP-β-CD</b>	4,8 (58,9 °C)	ND	90,6 (358,1 °C)
<b>Misturas físicas</b>			
<b>MFBFZD1 :1</b>	10,6 (89,5 °C)	ND	74,5 (326,6 °C)
<b>MFBFZD1:2</b>	11,4 (91,3 °C)	ND	75,4 (325,2 °C)
<b>MFHFZD1 :1</b>	4,2 (60,2 °C)	ND	86,1 (352,2 °C)
<b>MFHFZD1:2</b>	4,3 (59,3 °C)	ND	87,7 (354,4 °C)
<b>Complexos FZD:β-CD</b>			
<b>MBFZD1:1</b>	8,9 (85,8 °C)	ND	74,2 (324,4 °C)
<b>MBFZD1:2</b>	10,2 (91,5 °C)	ND	75,0 (322,7 °C)
<b>LBFZD1:1</b>	8,8 (60,2 °C)	11,8 (264,6 °C)	63,1 (325 °C)
<b>LBFZD1:2</b>	5,7 (56,7 °C)	10,0 (242,7 °C)	66,0 (325,1 °C)
<b>Complexos FZD:HP-β-CD</b>			
<b>MHFZD1:1</b>	4,3 (59,4 °C)	7,9 (247,2 °C)	78,8 (355,9 °C)
<b>MHFZD1:2</b>	4,6 (57,6 °C)	5,7 (255,2 °C)	82,2 (354,8 °C)
<b>LHFZD1:1</b>	3,3 (62,8 °C)	9,6 (271,0 °C)	74,2 (355,1 °C)
<b>LHFZD1:2</b>	4,2 (59,9 °C)	5,2 (263,1 °C)	82,2 (354,4 °C)

606

607 Semelhante ao observado para a β-CD, os termogramas FZD:HP-β-CD das  
608 misturas físicas 1:1 e 1:2 apresentaram similaridade, com pequena redução da perda  
609 de água por desidratação, para ambas as razões molares estudadas: 4,2% (1:1) e  
610 4,3% (1:2) (Tabela 2). Para os complexos FZD:HP-β-CD preparados por malaxagem,  
611 a diminuição da massa relativa à perda de água foi semelhante à das misturas físicas:

612 4,3% (1:1) e 4,6% (1:2). Já para os complexos FZD:HP- $\beta$ -CD por liofilização, as  
613 perdas de massa foram 3,3% ( $T_{\text{máxima}} = 62,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e 4,2% ( $T_{\text{máxima}} = 59,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para  
614 as razões molares 1:1 e 1:2, respectivamente. Em todos os termogramas, podem ser  
615 vistos outros dois eventos, com a primeira endoterma em temperaturas inferiores a  
616  $272 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , referentes à decomposição térmica do fármaco e, próximas a  $355 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , relativas  
617 à degradação da HP- $\beta$ -CD. Os menores valores relativos à perda de água e redução  
618 na temperatura de fusão do fármaco podem ser vistos para os produtos preparados  
619 por liofilização.

620

### 621 **3.2.2 Difração de raios X**

622

623 O uso de métodos que avaliam a modificação da forma cristalina, no contexto  
624 da preparação de complexos de inclusão com ciclodextrinas, é de grande interesse,  
625 pois, sabe-se que alterações na cristalinidade dos compostos levam a mudanças nas  
626 propriedades físico-químicas, especialmente, na solubilidade dos fármacos (Yu, 2001;  
627 Vajna et al., 2011).

628 A difração de raios X (DRX) é um método cristalográfico rápido e de fácil  
629 execução, capaz de detectar alterações na estrutura cristalina dos compostos, a partir  
630 da medida da intensidade de raios X difratados, incididos sob determinados ângulos,  
631 sobre as amostras sólidas (Raov, Mohamed, & Abas, 2014). Algumas CDs, no seu  
632 estado cristalino formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares as quais  
633 estabilizam tanto a conformação da molécula como, também, sua estrutura cristalina,  
634 gerando difratogramas com picos bem definidos (Raov, Mohamed, & Abas, 2014).  
635 Assim, o sucesso da complexação é confirmado mediante comparação dos  
636 difratogramas dos materiais de partida, das misturas físicas e dos complexos,  
637 observando-se o surgimento ou desaparecimento de picos, bem como alterações de  
638 intensidade (Cao; Guo, & Ping, 2005).

639 Nos difratogramas da FZD e da  $\beta$ -CD podem ser vistos inúmeros picos  
640 máximos de reflexão, o que sugere que ambas apresentam perfil difratométrico de  
641 compostos cristalinos, ao contrário do observado para a HP- $\beta$ -CD, característico de  
642 substâncias amorfas. Os perfis difratométricos das CDs estão em conformidade com  
643 a literatura (Veiga, & Merino, 2002; Dang et al, 2011; Martins et al., 2012). Os perfis  
644 difratométricos encontrados estão em conformidade também com as fotomicrografias

645 obtidas para os materiais de partida (Figura 7). É possível observar que a  $\beta$ -CD se  
646 apresenta como cristais cúbicos enquanto a FZD se apresenta na forma de lâminas  
647 regulares. Já a HP- $\beta$ -CD pode ser vista na forma amorfa. Os difratogramas e as  
648 fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura dos materiais de partida são  
649 dados na Figura 7.

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

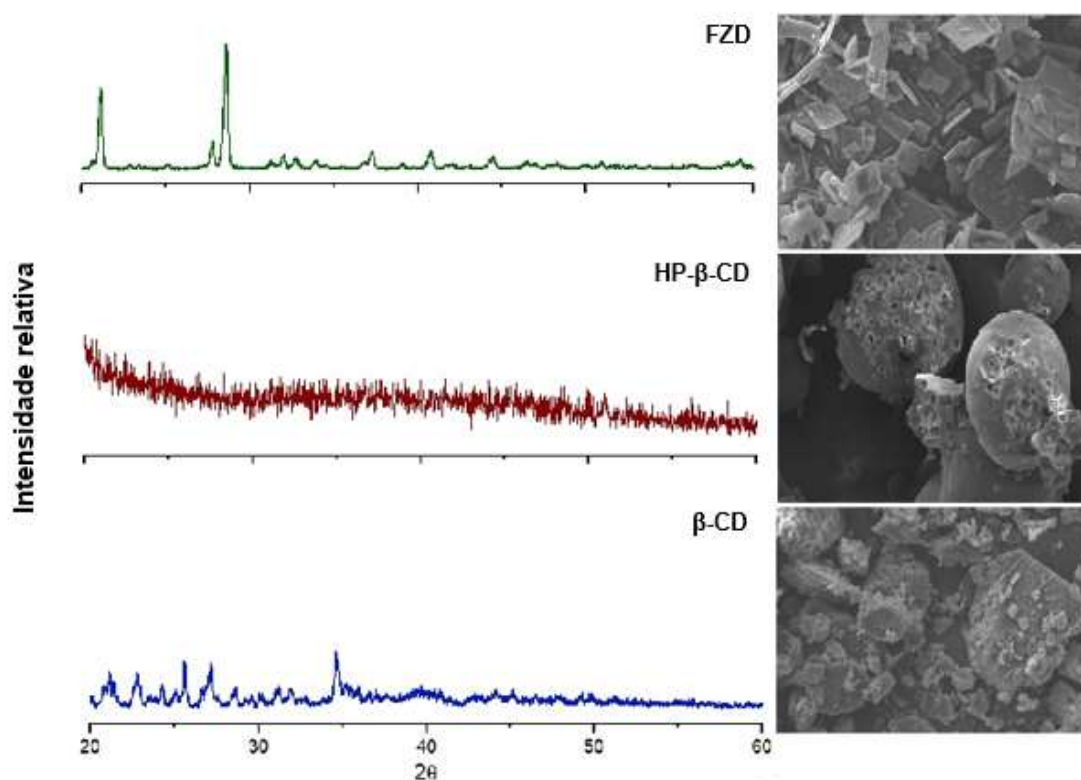
661

662

663

664

665

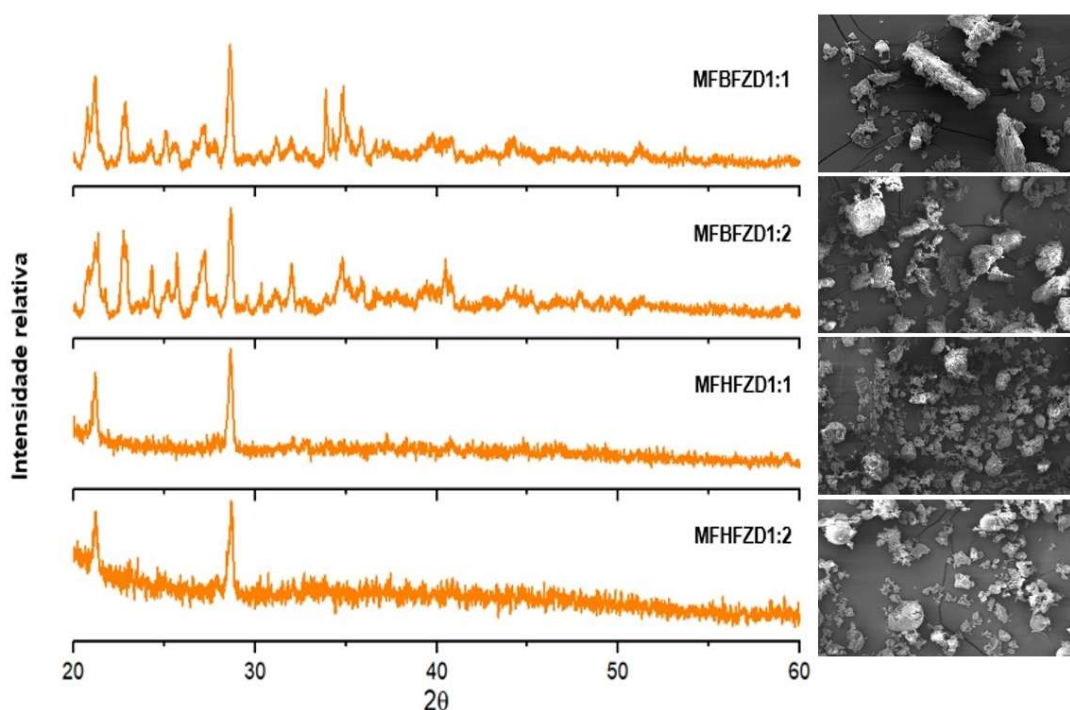


666 **Figura 7-** Difratogramas de raios-X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20  
667 keV) dos materiais de partida.

668

669 Os difratogramas e as fotomicrografias das amostras FZD: $\beta$ -CD podem ser  
670 vistos na Figura 9. Para os produtos da malaxagem, nas razões molares 1:1 e 1:2, os  
671 difratogramas são semelhantes aos das misturas físicas, sem alterações nos padrões  
672 difratométricos da FZD e da  $\beta$ -CD. Tais observações são confirmadas pelas  
673 fotomicrografias, nas quais podem ser vistos cristais do fármaco. Para os produtos da  
674 liofilização, pequenas alterações nos padrões de reflexão podem ser vistas para o  
675 produto LBFZD1:2. Nas fotomicrografias de ambos os produtos (LBFZD1:1 e  
676 LBFZD1:2), os cristais da FZD não podem ser identificados e há uma mistura de  
677 partículas de morfologia alterada, além da formação de agregados, ao contrário do

678 observado na imagem dos materiais de partida. Şoica e colaboradores (2012)  
 679 avaliaram a morfologia de complexos entre a betulina e derivados da  $\gamma$ -CD obtidos por  
 680 malaxagem e observaram nas microfotografias a presença de partículas de tamanho  
 681 reduzido, tendendo à agregação, sugerindo a presença de interação durante a  
 682 complexação. Os perfis difratométricos das misturas físicas FZD: $\beta$ -CD e FZD:HP- $\beta$ -  
 683 CD correspondem à sobreposição dos difratogramas do fármaco e das CDs, para  
 684 ambas as razões molares estudadas (Figura 8).



685

686 **Figura 8-** Difratogramas de raios-X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20  
 687 keV) das misturas físicas.

688

689 Para as amostras preparadas a partir da HP- $\beta$ -CD (Figura 10), alterações mais  
 690 significativas nos padrões de reflexão podem ser observadas nos difratogramas dos  
 691 produtos MFHFZD1:2 (preparada por malaxagem), LHFZD1:1 e LHFZD1:2 (preparadas  
 692 por liofilização), evidenciando a redução da cristalinidade e a existência de interações  
 693 entre as moléculas hóspede e hospedeira. Como pode ser visto nas fotomicrografias  
 694 destes produtos, ocorreu a formação de partículas com morfologia e tamanho  
 695 diferentes do observado para a FZD e para a CD, além da ausência das partículas do  
 696 fármaco e da HP- $\beta$ -CD. Tais achados comprovam a existência de amorfização das  
 697 partículas. Para a amostra MFHFZD1:1 podem ser vistos cristais da FZD. A maior



698 redução da cristalinidade foi observada para a amostra LBFZD1:2 e para as amostras  
699 preparadas a partir da HP- $\beta$ -CD, sugerindo que esta CD foi mais eficaz em se associar  
700 ao fármaco e alterar a forma cristalina da FZD, denotando eficiência na formação de  
701 Cls.

702

703

704

705

706

707

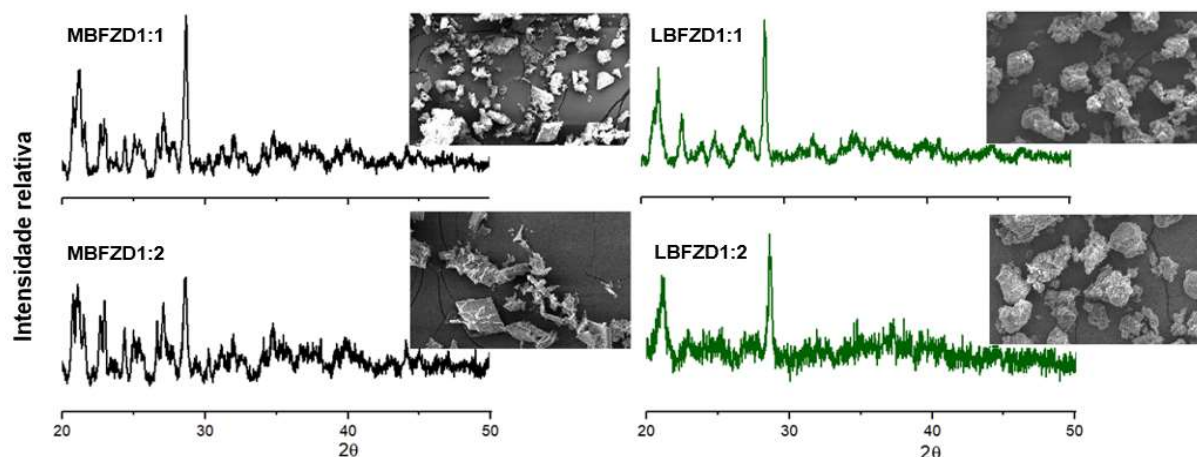
708

709

710

711

712



713 **Figura 9-** Difratomogramas de raios-X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20  
714 keV) dos complexos obtidos a partir da  $\beta$ -ciclodextrina.

715

716

717

718

719

720

721

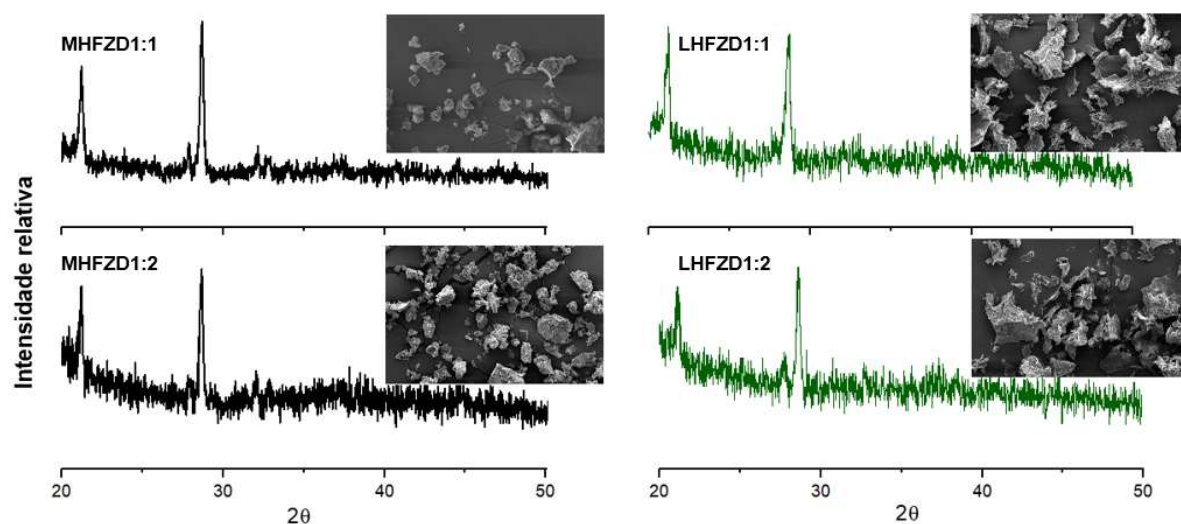
722

723

724

725

726



727 **Figura 10-** Difratomogramas de raios-X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20  
728 keV) dos complexos obtidos a partir da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

729

730

Resultados semelhantes foram encontrados por Loh, Tan e Peh (2016), ao prepararem ICs da norfloxacina baseados na  $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD pelas técnicas de



731 mistura física, malaxagem e evaporação do solvente. Aleen e colaboradores (2008),  
732 observaram pela técnica de DRX, que ocorreu maior redução da cristalinidade em CIs  
733 de cefdinir preparados com a HP- $\beta$ -CD quando comparada  $\beta$ -CD. Tang e  
734 colaboradores (2015) prepararam complexos de inclusão clorzoxazona: $\beta$ -CD e  
735 clorzoxazona:HP- $\beta$ -CD pelo método de liofilização, com o objetivo de aumentar a  
736 solubilidade e reduzir a toxicidade do fármaco. Os autores avaliaram os CIs pela  
737 técnica de DRX e observaram a ocorrência de amorfização dos complexos preparados  
738 a partir da HP- $\beta$ -CD como hospedeira.

739

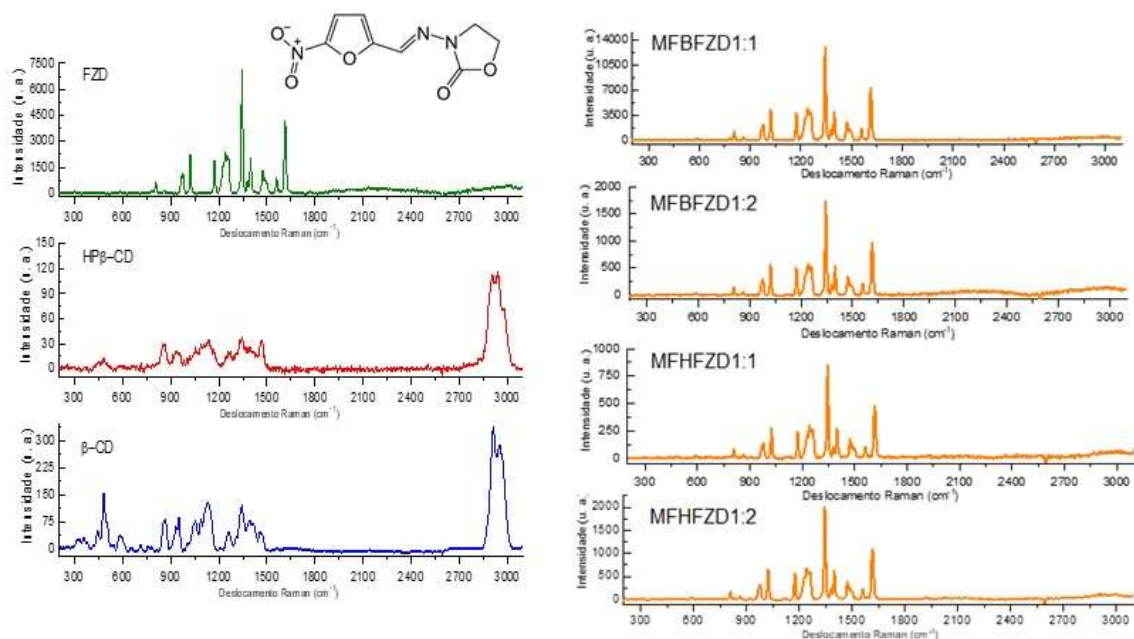
### 740 **3.2.3 Espectroscopia Raman**

741

742 A espectroscopia Raman se mostra útil para pesquisar a amorfização de  
743 fármacos após a associação dos CIs, em decorrência das interações das moléculas  
744 ou de parte das moléculas com o interior da cavidade das CDs (Hédoux, Guinet, &  
745 Descamps, 2011; Paudel, Rajjada, & Rantanen, 2015).

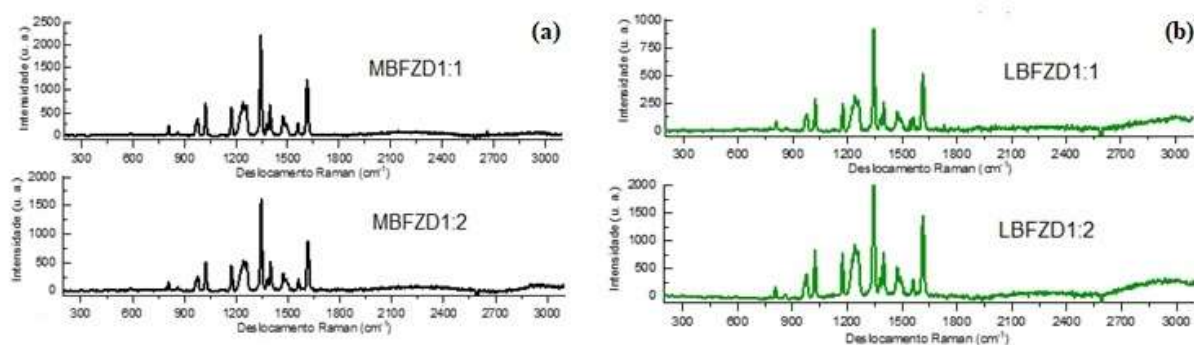
746 É possível notar no espectro da furazolidona, a presença de picos  
747 proeminentes, de grande intensidade, localizados entre 1000 e 1650  $\text{cm}^{-1}$ , dentre os  
748 quais, aqueles atribuídos à vibrações do estiramento simétrico nas ligações C-O-C do  
749 anel furânico ( $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$ ) e à vibrações do estiramento da ligação C=N ( $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ )  
750 (Zhang et al., 2012). O padrão de intensidade dos picos em espectros Raman,  
751 atribuídos à estrutura da  $\beta$ -CD e da HP- $\beta$ -CD, é menor, quando comparado aos da  
752 FZD, como pode ser visto nas imagens (Arrais, & Savarino, 2009). Assim, devido à  
753 elevada intensidade dos sinais da FZD, nos espectros Raman das misturas físicas,  
754 somente estes são observados, uma vez que se sobressaem (Figura 11).

755 Resultados semelhantes podem ser observados nos espectros dos complexos  
756 FZD: $\beta$ -CD, nas razões molares 1:1 e 1:2, preparados por malaxagem e liofilização,  
757 não havendo evidências de atenuação da cristalinidade (Figura 12). Por outro lado,  
758 para o produto obtido a partir da HP- $\beta$ -CD, preparado por malaxagem, na razão molar  
759 1:2 (MHFZD1:2), pode ser notada redução drástica na intensidade dos sinais da FZD.  
760 Modificações significativas também podem ser vistas nos espectros dos produtos  
761 FZD:HP- $\beta$ -CD obtidos por liofilização, para ambas as razões molares estudadas  
762 (Figura 13).



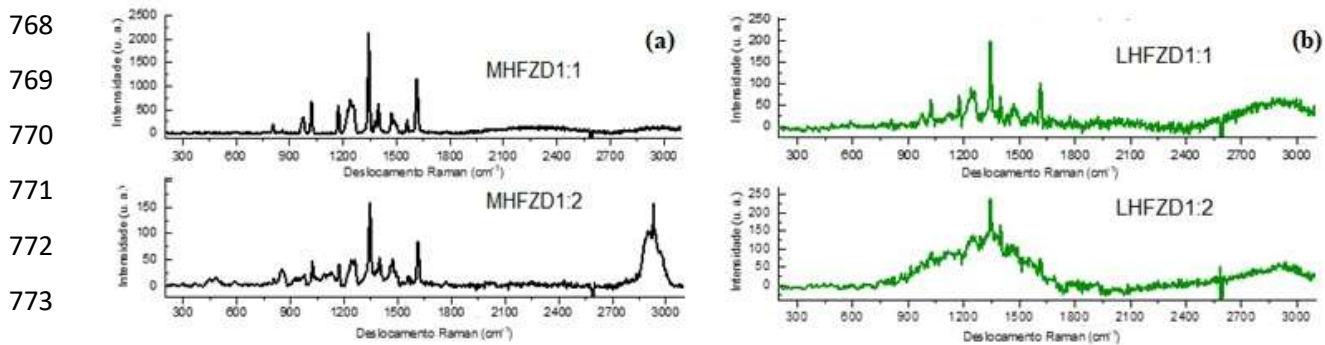
763 **Figura 11-** Espectro Raman dos materiais de partida e das misturas físicas.

764



765 **Figura 12-** Espectro Raman dos produtos FZD:β-CD preparados por (a) malaxagem  
766 e (b) liofilização.

767



775 **Figura 13-** Espectro Raman dos produtos FZD:HP-β-CD preparados por (a)  
776 malaxagem e (b) liofilização.

777 Nas imagens dos espectros fica evidente a ocorrência da atenuação da  
778 intensidade dos picos da FZD além da sobreposição de picos não resolvidos, o que  
779 se dá em função da restrição das vibrações das ligações presentes na FZD, originada  
780 da associação do fármaco com a cavidade das moléculas hospedeiras (Tijunelyte et  
781 al., 2017). Além de indicarem a existência de amorfização, estes achados são  
782 indicativos também do sucesso da complexação para as amostras MHFZD1:2,  
783 LHFZD1:1 e LHFZD1:2. Para estas, ocorreu redução da intensidade dos sinais da  
784 FZD, provavelmente, devido à redução da polarizabilidade molecular de elétrons que  
785 dos grupos que se associaram à CD, em função das interações existentes, levando à  
786 diminuição no espalhamento da luz incidente. Não há evidência de amorfização ou da  
787 formação de complexos preparados a partir da  $\beta$ -CD pela avaliação dos resultados de  
788 espectroscopia Raman, ao contrário do observado pelas análises térmicas e por  
789 DRX/SEM.

790

### 791 **3.2.4 RMN de $^{13}\text{C}$ no estado sólido**

792

793 As técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) em solução permitem  
794 não só a confirmação de ICs mas, também, a elucidação da estrutura dos complexos,  
795 identificando a parte da molécula hóspede que está incluída na cavidade da CD  
796 hospedeira (Pessine, Calderine & Alexandrino, 2012). Como os demais métodos de  
797 caracterização, a partir da comparação dos sinais dos espectros dos ICs com os dos  
798 materiais de partida e das misturas físicas, é possível confirmar a formação dos ICs  
799 (Borodi et al., 2008). Contudo, a principal desvantagem associada ao método é o alto  
800 custo do equipamento e dos solventes empregados (Malet-Martino, & Holzgrabe,  
801 2011).

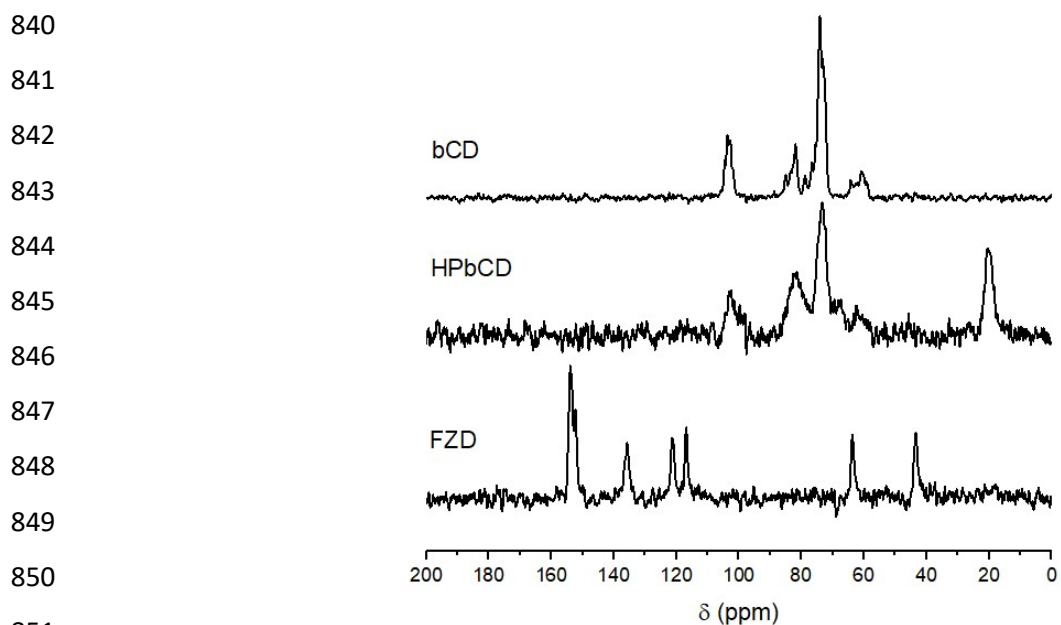
802 O RMN em estado sólido de  $^{13}\text{C}$  é uma das variáveis mais versáteis da técnica  
803 para o estudo da formação dos ICs, especialmente quando combinada com as  
804 técnicas de polarização cruzada e rotação de ângulo mágico (CP/MAS - *cross*  
805 *polarization/ magic-angle spinning*), uma vez que fornece espectros de  $^{13}\text{C}$  de alta  
806 resolução a partir de amostras sólidas, permitindo o estudo da morfologia (Koito,  
807 Yamada, & Ando, 2012; Veiga, Pecorelli, & Ribeiro, 2006). Para detecção da forma  
808 cristalina encontrada, os parâmetros espectrais avaliados são a falta de de

809 multiplicidade de sinais, presença de desvios químicos nos espectros e alterações na  
810 largura da linha padrão (Paradowska, & Waver, 2013). Arrúa e colaboradores (2015)  
811 prepararam CIs entre o praziquantel e diferentes CDs, pelo método de co-evaporação  
812 do solvente e empregaram técnicas de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  no estado sólido para  
813 elucidar as estruturas dos compostos formados e confirmar o sucesso da complexos.  
814 Os autores concluíram que a razão molar 1:2 pareceu ser a mais efetiva na formação  
815 dos complexos. A mesma técnica foi empregada por Ferreira e colaboradores (2015)  
816 que comprovaram o sucesso da complexação entre o albendazol e diferentes tipos de  
817 CDs.

818 No presente trabalho, no espectro registrado para a FZD pura, nota-se a  
819 presença de sinais bem definidos, com associações de picos e picos isolados  
820 estreitos, nas faixas de 150-160 ppm, 130-140 ppm, 92-117 ppm, 60-67 ppm e 40-45  
821 ppm. Tal espectro é consistente com a cristalinidade da amostra de FZD já revelada  
822 pelos métodos de espectroscopia RAMAN e DRX. Já no espectro registrado para a  $\beta$ -  
823 CD é possível observar a presença dos seis carbonos das unidades de D-  
824 glicopirranose, com sinais estreitos identificados na faixa de 55-110 ppm: picos na faixa  
825 100-110 ppm são devidos ao sítio atômico C<sub>1</sub>; na faixa 80-86 ppm, associado a C<sub>4</sub>;  
826 em 71-78 ppm, associado aos átomos de carbono C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub>; e, finalmente, sinais  
827 na faixa de 56-64 ppm, associados ao C<sub>6</sub>. A existência de vários picos, para cada sítio  
828 atômico, deve-se à ocorrência de diferentes orientações moleculares ou  
829 conformações na estrutura cristalina da CD (Furó et al., 1987; Priotti et al., 2015).

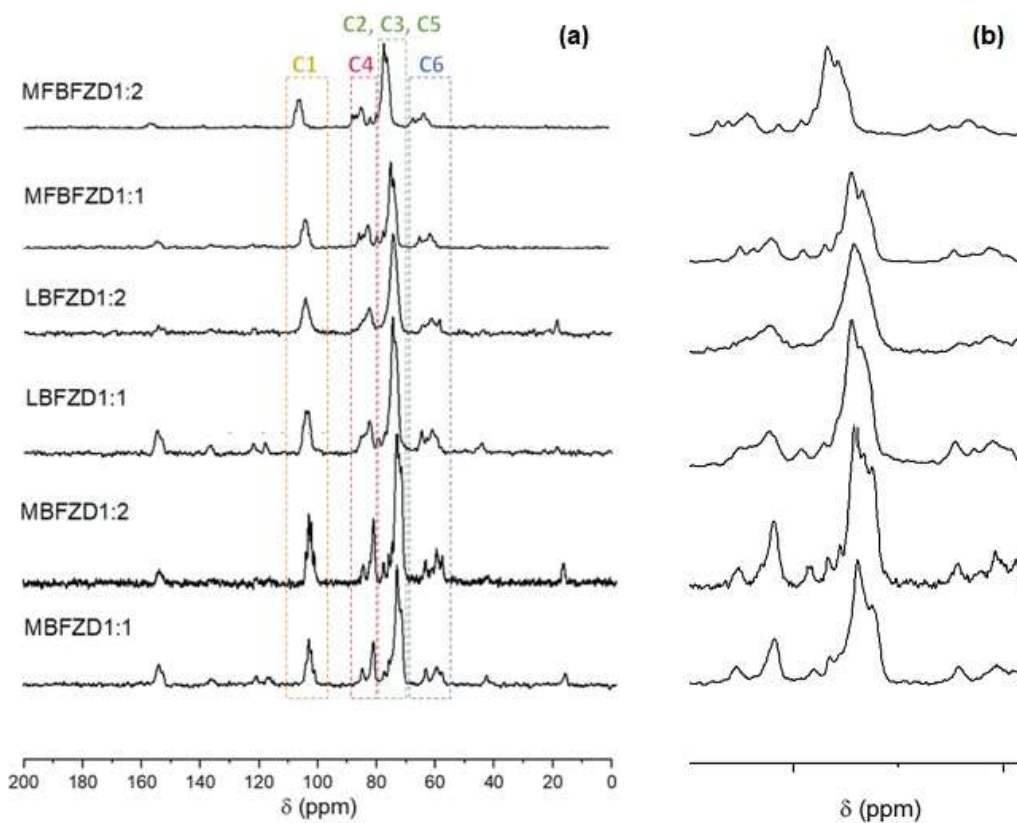
830 Ao contrário do observado no espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido da  $\beta$ -CD,  
831 e como corroborado pelos resultados das análises de espectroscopia RAMAN e DRX  
832 e, pela literatura, o espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido da HP- $\beta$ -CD é característico  
833 de um composto amorfo, sem a existência de múltiplas ressonâncias para um mesmo  
834 sítio atômico (Priotti et al, 2015). Para a HP- $\beta$ -CD, foram identificados picos nas faixas  
835 de 59-107 ppm, para o C<sub>1</sub>; 93-107 ppm, para C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub>; 69-76 ppm, para C<sub>4</sub>; 78-84  
836 ppm e 59-64 ppm, para C<sub>6</sub>. Os espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido da  $\beta$ -CD, da  
837 HP- $\beta$ -CD e da FZD, são dados na Figura 12. Os espectros obtidos para as misturas  
838 físicas e complexos baseadas na  $\beta$ -CD (FZD: $\beta$ -CD) podem ser vistos na Figura 1.

839



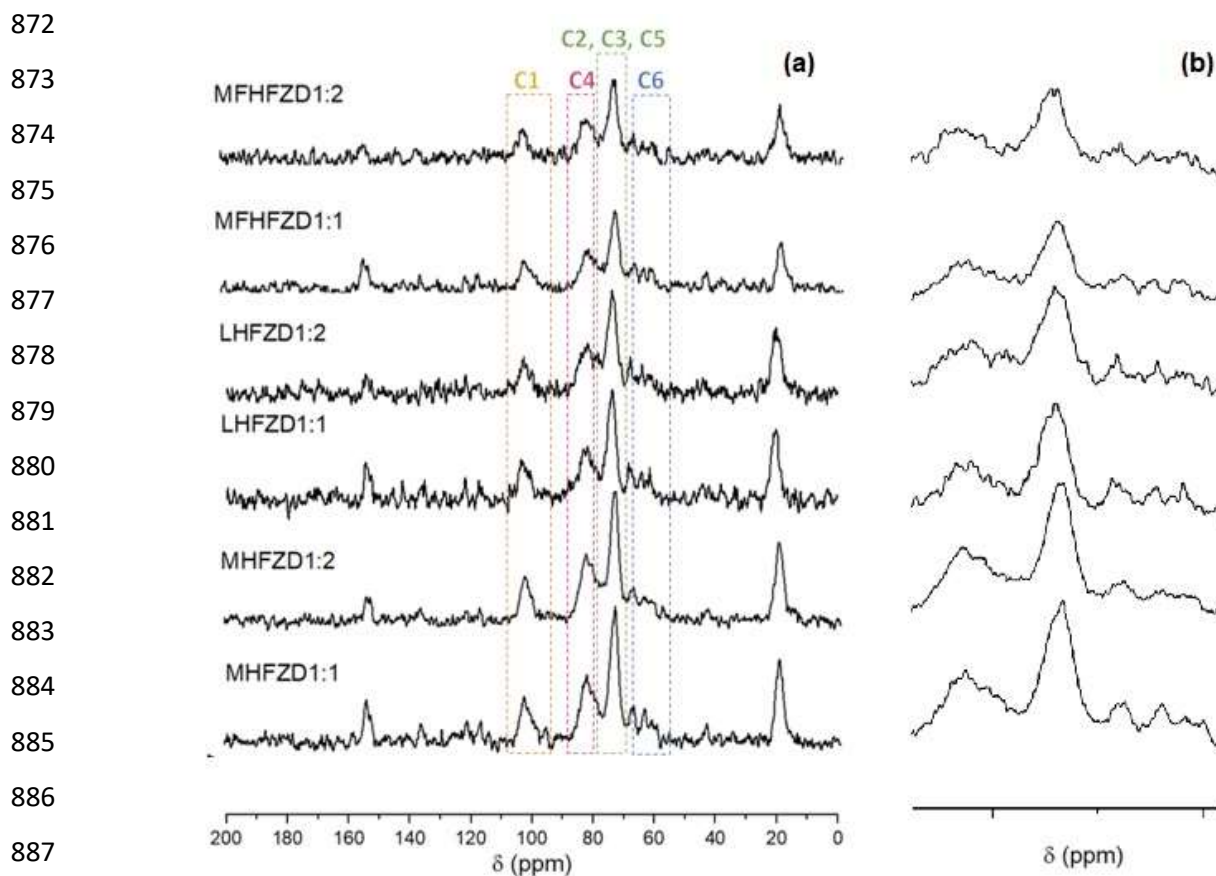
852 **Figura 14-** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido obtidos para a  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD e  
853 da FZD.

854



856 **Figura 15-** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido obtidos para os produtos baseados  
857 na  $\beta$ -CD: (a) faixa de 0 a 200 ppm e (b) ampliação da região entre 60 e 90 ppm.

858 Nos espectros das misturas físicas e dos complexos FZD: $\beta$ -CD (Figura 15),  
 859 alterações significativas nos sinais da  $\beta$ -CD somente são observadas no espectro da  
 860 amostra LBFZD1:2, no qual há convergência de sinais, entre 82-88 ppm, atribuídos  
 861 ao C4 da CD. A convergência de sinais, ou seja, a ausência de picos associados no  
 862 espectro sugere que as unidades de D-glicopiranosose adotaram conformação mais  
 863 simétrica em decorrência da complexação, culminando com sua amorfização (Lai et  
 864 al., 2003). Ainda, no espectro LBFZD1:2 nota-se a ausência de sinais da FZD em 156-  
 865 148 ppm, 124-114 ppm e 46-40 ppm, sugerindo que parte da estrutura do fármaco  
 866 está associada à ciclodextrina. Nos demais produtos, a ausência de sinais da FZD em  
 867 determinadas faixas, sugere a existência de interações entre as moléculas hóspede e  
 868 hospedeira. Contudo, a observação de sinais múltiplos nestes espectros, atribuídos  
 869 aos átomos de C2, C3, C5, C4 e C6 das unidades glicosídicas da  $\beta$ -CD, indica a  
 870 coexistência de diferentes arranjos estruturais no composto (Lima, 2001), o que  
 871 sugere a mistura dos produtos da complexação com os materiais de partida.



889 **Figura 16-** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido obtidos para os produtos baseados  
 890 na HP- $\beta$ -CD: (a) faixa de 0 a 200 ppm e (b) ampliação da região entre 60 e 80 ppm.

891 As alterações mais significativas nos sinais dos espectros dos produtos  
892 baseados na HP- $\beta$ -CD podem ser observadas no produto LHFZD1:2, nas regiões de  
893 108-98 ppm, atribuída ao C4 e, entre 88-68 ppm, referentes a C2, C3 e C4, com  
894 convergência de sinais. Neste mesmo espectro, há ausência de sinais da FZD em  
895 156-148 ppm, 124-114 ppm e 46-40 ppm, sugerindo que parte da estrutura do fármaco  
896 está associada à ciclodextrina. Nos demais produtos da complexação entre a FZD e  
897 a HP- $\beta$ -CD, assim como nos produtos da  $\beta$ -CD, a existência de sinais de C2, C3, C5,  
898 C4 e C6 das unidades glicosídicas da CD, sugerem a presença de uma mistura de  
899 compostos.

900

### 901 **3.2.5 Análise conjunta dos dados de caracterização**

902

903

904 De acordo com os resultados das análises térmicas, houve indícios da  
905 existência de interações nos produtos LBFZD1:2, MHFZD1:1, MHFZD1:2, LHFZD1:1  
906 e LHFZD1:2. Pela avaliação das imagens de MEV, pode-se notar a presença de  
907 cristais de furazolidona nas amostras MBFZD1:1 e MBFZD1:2 e, para todos os  
908 demais, é possível observar perda da estrutura cristalina da FZD e da  $\beta$ -CD,  
909 alterações da morfologia das partículas da HP- $\beta$ -CD e a formação de aglomerados, o  
910 que é indicativo da existência de interações entre as moléculas hóspede e hospedeira.  
911 A partir dos dados de difração de raios X, pode-se inferir que a maior redução da  
912 cristalinidade foi observada para as amostras LBFZD1:2, MHFZD1:2, LHFZD1:1 e  
913 LHFZD1:2, em concordância com os achados pelas técnicas de DSC e TG/DTG. Por  
914 outro lado, a análise dos espectros Raman indica a existência de amorfização para as  
915 amostras MHFZD1:2, LHFZD1:1 e LHFZD1:2, sendo as alterações mais significativas  
916 observadas neste último produto. Por fim, dados do RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido  
917 sugerem a ocorrência de interações efetivas nas amostras dos produtos LBFZD1:2 e  
918 LHFZD1:2.

919 Portanto, pode-se confirmar a formação de complexos para os produtos  
920 LBFZD1:2 e LHFZD1:2, havendo nas demais amostras, a ocorrência de interações  
921 entre as moléculas hóspede e hospedeira e, possivelmente, a existência de uma  
922 mistura de materiais de partida e seus produtos de associação.

923           Trabalhos na literatura relatam a formação de outros tipos de associações entre  
924 fármacos e CDs, denominadas “não-complexos”, nos quais são estabelecidas, entre  
925 as moléculas hóspede e hospedeira, interações fora da cavidade das CDs,  
926 especialmente mediante ligações de hidrogênio. Ainda, em soluções aquosas, as CDs  
927 podem formar agregados ou agregados micelares, contribuindo para os processos de  
928 solubilidade e permeabilidade de compostos fracamente solúveis em água (Messner  
929 et al., 2010). Diversos autores relatam a formação de agregados tipo micela entre  
930 diferentes tipos de CDs ( $\gamma$ -CD, HP- $\beta$ -CD e HP- $\gamma$ -CD) e fármacos como a  
931 hidrocortisona e a dexametasona, com aumento da solubilidade do fármaco (Loftsson,  
932 Másson, & Sigurdsson, 2002; Janssok et al, 2003; Jansook, Kurkov, & Loftsson, 2010).  
933 Os não-complexos ou agregados podem apresentar, além de solubilidade alterada,  
934 quando comparada à do fármaco puro, atividade biológica significativa (Garcia et al.,  
935 2012). Martins e colaboradores (2009), obtiveram produtos de associação entre a  $\beta$ -  
936 CD e o antimoniato de meglumina (MA) e, após pesquisa da existência de interações  
937 entre as moléculas, os autores confirmaram a formação de agregados entre a  $\beta$ -CD e  
938 o fármaco, na razão molar 1:1. Ao contrário dos fármacos comumente usados em  
939 associação com  $\beta$ -CD, o MA é altamente solúvel em água (solubilidade > 300 mg/  
940 mL). Garcia e colaboradores (2012) investigaram as interações moleculares entre a  
941  $\beta$ -CD ou a HP- $\beta$ -CD e a riboflavina e, avaliaram o potencial anticancerígeno dos  
942 compostos obtidos por liofilização, nas razões molares 1:1. Segundo os autores, não  
943 foram detectadas interações entre a riboflavina e a cavidade das CDs mas, os não  
944 complexos apresentaram maior solubilidade e atividade anticancerígena sobre  
945 linhagens de células PC3.

946

### 947 **3.2.6 Atividade leishmanicida e citotoxicidade *in vitro***

948

949           A atividade leishmanicida e as avaliações de citotoxicidade foram realizadas  
950 por métodos *in vitro*, em todas as amostras submetidas aos ensaios de  
951 caracterização. Os estudos foram realizados levando em consideração os requisitos  
952 básicos para avaliação do potencial de atividade *in vitro* apresentado por amostras  
953 com potencial atividade contra *Leishmania*, como recomendado pela Organização  
954 Mundial de Saúde. Segundo recomendações, os ensaios preliminares para a busca  
955 de novos agentes leishmanicidas devem atender a alguns pré-requisitos, tais como:



956 os métodos empregados devem oferecer medidas da atividade quantificáveis e  
 957 reprodutíveis; os compostos estudados devem oferecer respostas em pequenas  
 958 quantidades (inferior a 1,0 mg); os compostos devem apresentar atividade sobre  
 959 diferentes cepas; e, o método deve ser rápido e de baixo (Croft; & Brun, 2001).

960 Os testes empregados no presente estudo foram realizados por meio de semi-  
 961 automação, empregando o corante resazurina, avaliando o índice de inibição do  
 962 crescimento de formas promastigotas de cepas de *L. amazonensis*. Simultaneamente,  
 963 a avaliação citotóxica *in vitro* dos compostos foi pesquisada, utilizando linhagem  
 964 celular THP-1. Como pode ser observado na Tabela 3, a atividade citotóxica dos  
 965 compostos estudados sobre linhagens de macrófagos THP-1 foi superior a 450,00  
 966 µg/mL, para todas as amostras estudadas, o que sugere ausência de citotoxicidade.

967

968 **Tabela 3-** Valores obtidos para inibição do crescimento (IC<sub>50</sub>) sobre formas  
 969 promastigotas de *L. amazonensis*, medida da citotoxicidade sobre macrófagos THP-1  
 970 (CC<sub>50</sub>) após 72 horas e índice de seletividade (IS) calculado para os compostos

971

<b>Compostos</b>	<b>IC<sub>50</sub></b> <b>(µg/mL) ± EPM</b>	<b>CC<sub>50</sub></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>IS</b>
β-CD	> 100,00	> 450,00	> 4,50
HP-β-CD	≥ 100,00	≥ 200,00	> 2,00
FZD	6,3 ± 0,00	> 450,00	> 71,43
<b>Misturas físicas</b>			
MFBFZD1:1	18,93 ± 6,30	> 450,00	> 23,77
MFBFZD1:2	5,19 ± 0,43	> 450,00	> 86,70
MFHFZD1:1	5,20 ± 0,70	> 450,00	> 86,54
MFHFZD1:2	38,20 ± 0,00	> 450,00	> 11,78
<b>FZD:β-CD</b>			
MBFZD1:1	14,86 ± 4,36	> 450,00	> 30,28
MBFZD1:2	25,01 ± 0,69	> 450,00	> 17,99
LBFZD1:1	17,11 ± 1,57	> 450,00	> 26,30
LBFZD1:2	24,48 ± 0,00	> 450,00	> 18,38
<b>FZD:HP-β-CD</b>			

MHFZD1:1	48,45 ± 0,07	> 450,00	> 9,29
MHFZD1:2	2,07 ± 0,46	> 450,00	> 217,39
LHFZD1:1	17,99 ± 3,62	> 450,00	> 25,01
LHFZD1:2	3,20 ± 0,00	> 450,00	> 140,62

EPM: erro padrão da média.

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que todas amostras estudadas apresentaram atividade leishmanicida sobre *L. amazonensis*, quando comparadas aos controles negativos (CDs puras). Para a  $\beta$ -CD e a HP- $\beta$ -CD, foram necessárias concentrações maiores que 100,0  $\mu\text{g/mL}$  para redução da população de formas promastigotas de *L. amazonensis* em 50%. Por outro lado, o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* foi inibido pelo tratamento com a FZD pura, por doses com  $\text{IC}_{50}$  de 6,3  $\mu\text{g/mL}$ , sugerindo que as formas promastigoras da linhagem estudada foram suscetíveis à ação de uma pequena concentração do fármaco livre. Berman e Lee (1983) testaram a atividade leishmanicida de diferentes agentes antimicrobianos, dentre os quais, a furazolidona, sobre cepas de *L. tropica*. Os autores observaram que o fármaco foi capaz de eliminar 92% dos parasitos quando testado na concentração de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Reimão e colaboradores (2010), avaliaram a atividade leishmanicida da FZD contra as formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*, que foram suscetíveis ao fármaco, com valores de  $\text{IC}_{50}$  variando de 0,47  $\mu\text{g/mL}$  a 0,73  $\mu\text{g/mL}$ .

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

Para as misturas físicas MFBFZD1:2 (mistura física FZD: $\beta$ -CD, 1:2) e MFHFZD1:1 (mistura física FZD:HP- $\beta$ -CD, 1:1), os valores de  $\text{IC}_{50}$  observados foram próximos ao  $\text{IC}_{50}$  da FZD pura, ao contrário do observado para as demais, que apresentaram valores superiores. Estes resultados sugerem que o fármaco contido nas amostras não interagiu com as CDs. Já para os complexos MHFZD1:2 e LHFZD1:2, os valores da  $\text{IC}_{50}$  foram 3 e 2 vezes menores, respectivamente, que o obtido para o fármaco puro, o que sugere que a formação de complexo melhorou a solubilidade da FZD, favorecendo a a ação leishmanicida. Para todos as demais amostras, os valores obtidos para o  $\text{IC}_{50}$  foram superiores a 14,86  $\mu\text{g/mL}$ , sendo necessárias doses pelo menos 2,5 vezes maiores destes produtos para inibir o crescimento de 50% de *L. amazonensis*, quando comparadas à dose do fármaco puro,

1000 indicando que a solubilidade e/ou a permeabilidade do fármaco podem ter sido  
1001 alteradas negativamente.

1002 Silva e colaboradores (2012) estudaram a atividade leishmanicida de frações  
1003 de extratos ricos em alcalóides de espécies de plantas medicinais amazônicas através  
1004 da contagem diferencial de promastigotas usando o método do corante eritrosina B.  
1005 Os autores classificaram a atividade leishmanicida das frações com base nos valores  
1006 de  $IC_{50}$  da seguinte forma: frações com valores de  $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  foram classificadas  
1007 como altamente ativas; frações com valores de  $IC_{50}$  entre  $10 \mu\text{g/mL}$  e  $50 \mu\text{g/mL}$  foram  
1008 consideradas ativas; as frações moderadamente ativas apresentaram valores de  $IC_{50}$   
1009 entre  $50 \mu\text{g/mL}$  e  $100 \mu\text{g/mL}$ ; e, frações não ativas apresentaram valores de  $IC_{50} >$   
1010  $100 \mu\text{g/mL}$ . Com base nos mesmos critérios, podemos classificar a FZD e os produtos  
1011 da complexação MHFZD1:2 e LHFZD1:2, como sendo altamente ativos contra formas  
1012 promastigotas de *L. amazonensis*, nas condições testadas.

1013 No que diz respeito ao índice de seletividade (IS), os maiores valores  
1014 calculados foram observados para os produtos MHFZD1:2 e LHFZD1:2 (217,39 e  
1015 140,62, respectivamente). O IS reflete quantas vezes o fármaco utilizado é mais  
1016 seletivo ao parasito em relação às células empregadas nos ensaios de citotoxicidade,  
1017 sendo que valores de IS mais elevados indicam que o fármaco em estudo possui maior  
1018 toxicidade para os parasitos quando comparado aos macrófagos (Bézivin et al, 2003).

1019 Existem relatos na literatura acerca da complexação de fármacos como  
1020 estratégia para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas. Balaraman e  
1021 colaboradores (2015), prepararam complexos de inclusão entre a 2-n-propilquinolina  
1022 e a HP- $\beta$ -CD e demonstraram, através de métodos *in vitro*, que o complexo  
1023 apresentou atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. donovani*, com  
1024 valores de  $IC_{50}$  de  $6,22 \pm 0,82 \mu\text{M}$ , sem apresentar toxicidade em macrófagos.  
1025 Bhattacharya & Dash (2016) avaliaram a atividade leishmanicida da piperolactama A  
1026 (PL) sobre cepas de *L. donovani* dos tipos selvagem e resistentes a fármacos. Extratos  
1027 de PL isolados e purificados apresentaram um alto nível de atividade leishmanicida,  
1028 com valores de  $IC_{50}$  entre  $36,0 \mu\text{M}$  e  $103,0 \mu\text{M}$ . Complexos PL: $\beta$ -CD apresentaram  
1029 aumento de 10 vezes e de 4 a 10 vezes nos valores de  $IC_{50}$ , sobre cepas resistentes  
1030 a fármacos e de tipo selvagem, respectivamente. A redução na  $IC_{50}$  observada para  
1031 estes agentes pode ser atribuída à diminuição da solubilidade aparente da FZD em  
1032 decorrência da existência de alterações na cristalinidade dos compostos, após a

1033 complexação com as moléculas hospedeiras. Demicheli e colaboradores (2004)  
1034 prepararam complexos de inclusão entre  $\beta$ -CD e antimoniato de meglumina em  
1035 diferentes proporções molares através do método de liofilização e estudaram a  
1036 atividade leishmanicida dos complexos. A eficácia sobre *L. amazonensis* foi avaliada  
1037 *in vivo*. Animais tratados diariamente com os complexos pela via oral desenvolveram  
1038 lesões significativamente menores do que aqueles tratados com o antimoniato de  
1039 meglumina puro. Segundo os autores, os dados mostraram claramente a relação  
1040 estabelecida entre a complexação e a melhor biodisponibilidade do antimônio pela via  
1041 oral.

1042

#### 1043 **4 Conclusões**

1044

1045 A análise conjunta dos resultados de DSC, TG/DTG, DRX, MEV,  
1046 espectroscopia Raman e RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido, sugere o sucesso na formação  
1047 de complexos a partir do uso da  $\beta$ -CD (LBCD1:2) e da HP- $\beta$ -CD (LHFZD1:2), ambos  
1048 preparados por liofilização e na razão molar 1:2. Para as demais amostras, as técnicas  
1049 de análise evidenciaram a ocorrência de modificações nos espectros, o que sugere a  
1050 existência de interações entre a FZD e as CDs, com formação de agregados do tipo  
1051 não-complexos. Pelas técnicas de análises térmicas, deslocamentos nas  
1052 temperaturas de detecção da desidratação, da fusão do fármaco e da  
1053 termod decomposição das moléculas de partida, puderam ser notadas. Alterações na  
1054 cristalinidade foi confirmada pelos demais métodos. Os resultados encontrados nos  
1055 ensaios da atividade leishmanicida comprovam que, tanto o fármaco livre quanto os  
1056 produtos de complexação propostos apresentaram atividade contra formas  
1057 promastigotas de *L. amazonensis*, sendo os produtos MHFZD1:2 e LHFZD1:2, os  
1058 candidatos mais promissores para o uso pretendido, uma vez que apresentaram os  
1059 menores valores de  $\text{IC}_{50}$ . Para todos os demais, apesar da existência de atividade  
1060 leishmanicida e da não toxicidade, os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram maiores que o observado  
1061 para o fármaco puro. Assim, pode-se concluir que a formação de complexos e  
1062 agregados entre a furazolidona e ciclodextrinas de interesse farmacêutico é uma  
1063 estratégia promissora para o desenvolvimento de medicamentos antileishmania para  
1064 uso veterinário.

1065

1066 **Agradecimentos:** os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de  
1067 pessoa de Nível Superior (CAPES, Brasil) pelo auxílio financeiro concedido e a  
1068 Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado do Espírito Santo (FAPES,  
1069 Brasil) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq,  
1070 Brasil), pela concessão de bolsas de iniciação científica.

1071

## 1072 Referências

1073

- 1074 1. Aguiar, M.R.M.P., Gemal, A.L. & San Gil, R.A.S. (1999). Caracterização de  
1075 polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado  
1076 sólido. *Química Nova*, 22 (4), 553-564.  
1077
- 1078 2. Alam, M., Paget, T & Elkordy, A.A. (2016). Formulation and advantages of  
1079 furazolidone in liposomal drug delivery systems. *European Journal of*  
1080 *Pharmaceutical Sciences*, 10 (84), 139-145.  
1081
- 1082 3. Aleen, O., Kuchekar, B., Pore, Y. & Late S. 2008. Effect of beta-cyclodextrin  
1083 and hydroxypropyl beta-cyclodextrin complexation on physicochemical  
1084 properties and antimicrobial activity of cefidifinir. *Journal of Pharmaceutical and*  
1085 *Biomedical Analysis*, 47 (3), 535-540.  
1086
- 1087 4. Araújo, M.V.G., Vieira, E.K.B., Lázaro, G.S., Conegero, L.S., Ferreira, O.P.,  
1088 Almeida, L.E., Barreto, L.S., Costa-Jr, N.B. & Gimenez, I.F., (2007). Inclusion  
1089 complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin:  
1090 characterization, phase solubility and molecular modeling. *Bioorganic &*  
1091 *Medicinal Chemistry*. 15, 5752–5759.  
1092
- 1093 5. Arrais, A., & Savarino, P. (2009). Raman spectroscopy is a convenient  
1094 technique for the efficient evaluation of cyclodextrin inclusion molecular  
1095 complexes of azo-dye colorants and largely polarisable guest molecules.  
1096 *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 64(1-2), 73–81.  
1097
- 1098 6. Arrúa, E.C., Ferreira, M.J.G., Salomon, C.J. & Nunes, T.G. (2015). Elucidating  
1099 the guest-host interactions and complex formation of praziquantel and  
1100 cyclodextrin derivatives by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectroscopy,  
1101 *International Journal of Pharmaceutics*, 496 (2), 812-821.
- 1102 7. Balaraman, K., Fathi Moussa, N.C.V., Sandrine Cojean, J.V., Christian Bories,  
1103 S.P., Ventikasamy Kesavan, B.F. & Loiseau, P.M. (2015). In vitro and in vivo  
1104 antileishmanial properties of a 2-n-propylquinoline hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin  
1105 formulation and pharmacokinetics via intravenous route, *Biomedicine &*  
1106 *Pharmacotherapy*, 76,2015, 127-133.  
1107
- 1108 8. Berman, J.D. & Lee, L.S. (1983). Activity of oral drugs against *Leishmania*  
1109 *tropica* in human macrophages in vitro. *The American Journal of Tropical*  
1110 *Medicine and Hygiene*, 32, 947-951.

- 1111  
1112 9. Bézivin, C., Tomasi, S., Dévéhat, F. L., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity  
1113 of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*,  
1114 10 (1), 499–503.  
1115
- 1116 10. Bhattacharya, S.K. & Dash, A.P. (2016). Treatment of visceral leishmaniasis:  
1117 options and choice. *The lancet Infectious Diseases*, 16(2), 142-143.  
1118
- 1119 11. Borodi, G., Bratu, I., Dragan, F., Peschar, R., Helmholdt, R.B. & Hernanz, A.  
1120 (2008). Spectroscopic investigations and Crystal structure from synchrotron  
1121 powder data of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with atenolol.  
1122 *Spectrochimica Acta Part A*, v.70, 1041-1048.  
1123
- 1124 12. Brewster, M. E. & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical  
1125 solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (7), 645-66.  
1126
- 1127 13. Cao, F., Guo, J. & Ping Q. (2005). The physicochemical characteristics of  
1128 freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. *Drug*  
1129 *Development and Industrial Pharmacy*, 31 (8), 747-56.  
1130
- 1131 14. Carvalho, S.G., Siqueira, L.A., Zanini, M.S., Matos, A.P.S., Quaresma, C.H.,  
1132 Silva, L.M., Andrade, S.F., Severi, J.A. & Villanova, J.C.O. (2018).  
1133 Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based  $\beta$ -  
1134 cyclodextrin complexes in *Leishmania amazonensis*. *Research in Veterinary*  
1135 *Science*, 119, 143-153.  
1136
- 1137 15. Corrêa, D.H.A., Melo, P.S., Carvalho, C.A.A., Azevedo, M.B.M. & Haun, N., M.  
1138 (2005). Dehydrocrotonin and its  $\beta$ -cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79  
1139 fibroblasts and rat cultured hepatocytes, *European Journal Pharmacology*, 510,  
1140 17-24.  
1141
- 1142 16. Croft, S. L., & Brun, R. (2001). In vitro and in vivo models for the identification  
1143 and evaluation of drugs active against *Trypanosoma* and *Leishmania*. In: A. H.  
1144 Fairlamb, R. G. Ridley, & H. J. Vial, *Drugs against parasitic diseases: R&D*  
1145 *methodologies and issues*, 165- 176.  
1146
- 1147 17. Dang, Z., Xin Song, L., Qing Guo, X., Yun Du, F., Yang, J., & Yang, J.  
1148 (2011). Applications of Powder X-Ray Diffraction to Inclusion Complexes of  
1149 Cyclodextrins. *Current Organic Chemistry*, 15(6), 848–861.
- 1150 18. Demicheli, C., Ochoa, R., Silva, J.B.B., Falcão, C.A.B., Rossi-Bergman, B.,  
1151 Sinisterra, R.D. & Frézard, F. (2004). Oral delivery of meglumine antimoniate-  
1152  $\beta$ -cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *AOAC*, 48 (1), 100-103.  
1153
- 1154 19. Ferreira, M.J.G., Leonardi, A.G.D., Salomon, C.J., Celina Lamas, M. & Nunes,  
1155 T.G. (2015).  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR studies on albendazole and  
1156 cyclodextrin albendazole complexes. *Carbohydrate Polymers*, 123, 130-135.  
1157
- 1158 20. Frézard, F., Martins, P.S., Bahia, A.P.C.O., Le Moyec, L., De Melo, A.L.,  
1159 Pimenta, A.M.C., Salerno, M., Silva, J.B.B. & Demicheli, C. (2008). Enhanced

- 1160 oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ $\beta$ -cyclodextrin  
1161 nanoassemblies. *International Journal Pharmaceutic*, 347,102-108.  
1162
- 1163 21. Furó, I., Pócsik, I., Tompa, K., Stadler, K. & Szejthi, J. (1986). Solid state  $^1\text{H}$ -  
1164 NMR study of  $\beta$ -cyclodextrin-water complexes. *Carbohydrate Polymers*, 6 (2),  
1165 85-93.  
1166
- 1167 22. Garcia, J., Martins, L.G. & Pons, M. (2012). NMR Spectroscopy in Solution.  
1168 *ChemInform*, 43(28).  
1169
- 1170 23. Gil, V.M.S. & Geraldes, C.F.G.C; *Ressonância magnética nuclear –*  
1171 *fundamentos, métodos e aplicações*. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa,  
1172 1987.  
1173
- 1174 24. Giordano, F., Novak, C. & Moyano, J.R. (2001). Thermal analysis of  
1175 cyclodextrin and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380, 123-  
1176 151.  
1177
- 1178 25. Gould, S. & Scott, R.C. (2005). 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): A  
1179 toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1451-1459.  
1180
- 1181 26. Günther, H. (1994). NMR spectroscopy: basic principles, concepts and  
1182 applications in chemistry, (2th ed).  
1183
- 1184 27. Hédoux, Y. & Guinet, M. (2011) Descamps, The contribution of Raman  
1185 spectroscopy to the analysis of phase transformations in pharmaceutical  
1186 compounds, *International Journal of Pharmaceutics*. 417, 17–31.  
1187
- 1188 28. Jambhekar, S.S. & Breen, P. (2016). Cyclodextrins in pharmaceutical  
1189 formulations I: structure and physicochemical properties, formation of  
1190 complexes, and types of complex. *Drug Discovery Today*, 21 (2), 356-362.  
1191
- 1192 29. Jansook, P., Ritthidej, G. C., Ueda, H., Stefánsson, E., & Loftsson, T.  
1193 (2010).  $\gamma$ CD/HPyCD mixtures as solubilizer: solid-state characterization and  
1194 sample dexamethasone eye drop suspension. *Journal of Pharmacy &*  
1195 *Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 336-349.  
1196
- 1197 30. Jansook, P., Kurkov, S.V., Loftsson, T. (2010). Cyclodextrins as solubilizers:  
1198 formation of complex aggregates. *Journal of Pharmaceutical Science*, 99, 719–  
1199 729.  
1200
- 1201 31. Koito, Y., Yamada, K. & Ando, S. (2012). Solid-state NMR and wide-angle X-  
1202 Ray diffraction study of hydrofluoroether/  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex.  
1203 *Journal of inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 76 (1-2), 143-150.  
1204
- 1205 32. Lai, S., Locci, E., Piras, A., Porcedda, S., Lai, A. & Marongiu, B. (2003).  
1206 Imazalil–cyclomaltoheptaose ( $\beta$  cyclodextrin) inclusion complex: preparation by

- 1207 supercritical carbon dioxide and  $^{13}\text{C}$  CPMAS and  $^1\text{H}$  NMR characterization.  
1208 *Carbohydrate Research*, 338 (21), 2227-2232.  
1209
- 1210 33. Lahiani-Skiba, M., Coquard, A., Bounoure, F., Vérité, F., Arnaud, P. & Skiba,  
1211 M., (2007). Mebendazole complexes with various cyclodextrins: preparation and  
1212 physicochemical characterization. *Journal of inclusion Phenomena and*  
1213 *Macrocyclic Chemistry*. 57, 197–201.  
1214
- 1215 34. Leonardi, D., Bombardiere, M.E. & Salomon, C.J., (2013). Effects of  
1216 benzimidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral  
1217 administration to rats. *International Journal Biological Macromolecules*, 62,  
1218 543–548.  
1219
- 1220 35. Lima, S., Gonçalves, I.S., Ribeiro-Claro, P., Pillinger, M., Lopes A.D., Ferreira,  
1221 P., Teixeira-Dias, J.J.C., Rocha, J. & Romão C.C. (2001). Interactions of  
1222 cationic and neutral molybdenum complexes with  $\beta$ -cyclodextrin host  
1223 molecules. *Organometallics*, 20 (11), 2191–2197.  
1224
- 1225 36. Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M. & Järvinen, T. (2005). Cyclodextrins in drug.  
1226 *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2 (2), 335-351.  
1227
- 1228 37. Loftsson, T., Másson, M., & Sigurdsson, H.H. (2002). Cyclodextrins and drug  
1229 permeability through semi-permeable cellophane membranes. *International*  
1230 *Journal of Pharmacy*, 232, 35-43.  
1231
- 1232 38. Loh, G. O. K., Tan, Y. T. F., & Peh, K.-K. (2016). Enhancement of norfloxacin  
1233 solubility via inclusion complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivative  
1234 hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(4),  
1235 536–546.  
1236
- 1237 39. Lopes, M.S., Sales Jr, P.A.S., Lopes, A.G.F., Yoshida, M.I., Silva, T.H.A.S.,  
1238 Romanha, A.J., Alves, R.J. & Oliveira, R.B., (2011). The activity of a  
1239 metronidazole analogue and its  $\beta$ -cyclodextrin complex against *Trypanosoma*  
1240 *cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (8), 1055-1057.  
1241
- 1242 40. Lyra, M.A.M., Soares-Sobrinho, J.L., Figueiredo, R.C.B.Q., Sandes, J.M., Lima,  
1243 A.A.M., Tenório, R.P., Fontes, D.A.F., Santos, F.L.A., Rolim, L.A. & Rolim-Neto,  
1244 P.J. (2012). Study of benzimidazole–cyclodextrin inclusion complexes,  
1245 cytotoxicity and trypanocidal activity, *Journal of inclusion Phenomena and*  
1246 *Macrocyclic Chemistry*, 73, 397-404.  
1247
- 1248 41. Malet-Martino, M. & Holzgrabe, U. (2011). NMR techniques in biomedical and  
1249 pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical of Biomedical Analysis*, 55,  
1250 1–15.  
1251
- 1252 42. Marian, E., Jurca, T., Kacso, I., Miclaus, M & Bratu, I. (2013). Interactions  
1253 analysis between furazolidone and excipients used in pharmaceutical forms.  
1254 *Revista de Chimie*, 64 (11), 1275-1278.  
1255



- 1256 43. Martin Del Valle, E.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process*  
1257 *Biochemistry*, 39 (9), 1033-1046.  
1258
- 1259 44. Martins, M.H; Calderini, A & Pessine, F.B.T. (2012). Host–guest interactions  
1260 between dapsone and b-cyclodextrin (Part II): thermal analysis, spectroscopic  
1261 characterization, and solubility studies. *Journal of Inclusion Phenomena*  
1262 *Macrocyclic Chemistry*, 74 (1-4), 109–116.  
1263
- 1264 45. Martins, P. S., Ribeiro, R.R., Bahia, A.P.C., Neto, R.L.M., Frézard, F., Pimenta,  
1265 A.M.C., Melo, A.L., Le Moyec, L. & Demicheli, C. (2009). Physicochemical  
1266 characterization of orally-active meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin  
1267 nanoassemblies: non-inclusion interactions and sustained drug release  
1268 properties. *Brazilian Journal of Physics*, 39 (1A), 223-225.  
1269
- 1270 46. Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., & Loftsson, T. (2010). Self-  
1271 assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of*  
1272 *Pharmaceutics*, 387(1-2), 199–208.  
1273
- 1274 47. Neal, R.A., Bueren, J. & Hooper, J. (1988). The activity of nitrofurazone and  
1275 furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major* and *L. enriettii* in vitro and  
1276 in vivo. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, 82 (5), 453-456.  
1277
- 1278 48. Paradowska, K. & Wawer, I., (2013). Solid-state NMR in the analysis of drugs  
1279 and naturally occurring materials, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*  
1280 *Analysis*, 93, 27-42.  
1281
- 1282 49. Passos, S.R., Rodrigues, T.A., Madureira, A.P., Giunchetti, R.C. & Zanini, M.S.  
1283 (2014). Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone  
1284 and domperidone. *International Journal Antimicrobial Agents*, 44 (5), 463-465.  
1285
- 1286 50. Paudel, A., Rajjada, D. & Rantanen, J. (2015). Raman spectroscopy in  
1287 pharmaceutical product design. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89, 3-20.  
1288
- 1289 51. Pessine, F.B.T., Calderini, A. & Alexandrino, G.L. (2012). Review: Cyclodextrin  
1290 Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. *Magnetic Resonance*  
1291 *Spectroscopy*, 264.  
1292
- 1293 52. Priotti, J., Ferreira, M.J.G., Lamas, M.C., Leonardi, D., Salomon, C.J. & Nunes,  
1294 T.G. (2015). First solid-state NMR spectroscopy evaluation of complexes of  
1295 benzimidazole with cyclodextrin derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 131, 90-97.  
1296
- 1297 53. Raoov, M.; Mohamad, S. & Abas, M.R. (2014). Synthesis and characterization  
1298 of  $\beta$ -cyclodextrin functionalized ionic liquid polymer as a macroporous material  
1299 for the removal of phenols and As(V). *International Journal of Molecular*  
1300 *Sciences*, 5, 100-119.  
1301
- 1302 54. Reimão, J.Q., Taniwaki, N.N. & Tempone, A.G. (2010). Furazolidone is a  
1303 selective in vitro candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural  
1304 study. *Parasitology Research*, 106 (6), 1465-1469.

1305  
1306  
1307  
1308  
1309  
1310  
1311  
1312  
1313  
1314  
1315  
1316  
1317  
1318  
1319  
1320  
1321  
1322  
1323  
1324  
1325  
1326  
1327  
1328  
1329  
1330  
1331  
1332  
1333  
1334  
1335  
1336  
1337  
1338  
1339  
1340  
1341  
1342  
1343  
1344  
1345  
1346  
1347  
1348  
1349  
1350  
1351  
1352  
1353

55. Rowe, R.C., Sheskey, P.J. & Quinn, M.E. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients. (6th ed). London: Pharmaceutical Press.
56. Sasani, F., Javanbakht, J., Samani, R. & Shirani, D. (2016) Canine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitic Diseases*, 40 (1), 57-60.
57. Silva, F.M.A., Koolen, H.H.F.K., Lima, J.P.S., Santos, D.M.F., Jardim, I.S., Souza, A.D.L. & Pinheiro, M.L.B., (2012). Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from Amazonian unonopsis species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22, 1368–1371.
58. Singh, R., Bharti, N., Madan, J. & Hiremath, N. (2010). Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2 (3), 171-183.
59. Sobrinho, J.L.S. & Soares, M.F.L.R. (2011). Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. *Química Nova*, 34 (9), 1534-1538.
60. Şoica, C., Dehelean, C., Danciu, C., Wang, H.M., Wenz, G. Ambrus, R., Bojin, F. & Anghel, M. (2012). Betulin complex in  $\gamma$ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in vitro and in vivo tumor models. *International Journal of Molecular Science*, 13(11), 14992-15011.
61. Songkro, S., Hayook, N., Jaisawang, J., Maneenuan, D., Chuchome, T. & Kaewnopparat, N. (2012) Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repelente. *Journal of inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 72, 339-355.
62. Song, L.X. & Xu, P., (2008). A comparative study on the thermal decomposition behaviors between  $\beta$ -cyclodextrin and its inclusion complexes of organic amines. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112, 11341–11348.
63. Takahashi, A.I., Veiga, F.B. & Ferraz, H.G. (2012a). A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization - Part I: phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 12 (1), 1-6.
64. Takahashi, A.I., Veiga, F.B. & Ferraz, H.G. (2012b). A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization - Part II: X-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 12 (1)8-15.
65. Tang, P., Li, S., Wang, L., Yang, H., Yan, J., & Li, H. (2015). Inclusion complexes of chlorzoxazone with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers*, 131, 297–305.

- 1354 66. Tempone, A.G., Mortara, A.H.H. & Reimão, J.Q. (2010) Therapeutic evaluation  
1355 of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral  
1356 leishmaniasis. *International Journal Antimicrobial Agents*, 36 (2), 159-163.  
1357
- 1358 67. Tijnelyte, I., Dupont, N., Milosevic, I., Barbey, C., Rinnert, E., Lidgi-Guigui, N.,  
1359 Guenin, E. & de la Chapelle, M.L. (2017). Investigation of aromatic hydrocarbon  
1360 inclusion into cyclodextrins by Raman spectroscopy and thermal analysis.  
1361 *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (35), 22077-27089.  
1362
- 1363 68. Vajna, B., Farkas, I., Farkas, A., Pataki, H., Nagy, Z., Madarász, J. & Marosi,  
1364 G.(2011). Characterization of drug-cyclodextrin formulations using Raman  
1365 mapping and multivariate curve resolution. *Journal of Pharmaceutical and  
1366 Biomedical Analysis*, 56, 38-44.  
1367
- 1368 69. Veiga, F. J. B., Pecorelli, C. C. M. F. & Ribeiro, S. S. L. (2006). As ciclodextrinas  
1369 e a tecnologia farmacêutica, (1th.ed), 228 p.  
1370
- 1371 70. Veiga, M.D. & Merino, M. (2002) Interactions of oxyphenbutazone with different  
1372 cyclodextrins in aqueous medium and in the solid state. *Journal of  
1373 Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 28, 973-982.  
1374
- 1375 71. Vogt, F.G. & Strohmeier, M. (2012). 2D solid-state NMR analysis of inclusion in  
1376 drug-cyclodextrin complexes. *Molecular pharmaceuticals*, 9 (11), 3357-3374.  
1377
- 1378 72. Yu, L., (2001). Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization  
1379 and stabilization, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 48, 27–42.  
1380
- 1381 73. Zhang, Y., Huang, Y., Zhai, F., Du, R., Liu, Y. & Lai, K. (2012). Analyses of  
1382 enrofloxacin, furazolidone and malachite green in fish products with surface-  
1383 enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 135, 845-850.  
1384