1º PRÊMIO UFES DE TESES E DISSERTAÇÕES

VOLUME 4

Suzana Gonçalves Carvalho

Tratamento da leishmaniose cutânea canina: estudo com ciclodextrinas

EDUFES

1º PRÊMIO **UFES** DE **TESES** E **DISSERTAÇÕES**

VOLUME 4

Suzana Gonçalves Carvalho

Tratamento da leishmaniose cutânea canina: estudo com ciclodextrinas

EDUFES

Vitória, 2025

Universidade Federal
do Espírito Santo

Reitor
Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro

Vice-reitora
Sonia Lopes Victor

Chefe de Gabinete
Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt

EDUFES
EDITORA

Editora Universitária – Edufes

Filiada à Associação Brasileira
das Editoras Universitárias (Abeu)

Av. Fernando Ferrari, 514
Campus de Goiabeiras
Vitória – ES · Brasil
CEP 29075-910

+55 (27) 4009-7852
edufes@ufes.br
www.edufes.ufes.br

Diretor da Edufes
Wilberth Salgueiro

Conselho Editorial
Ananias Francisco Dias Junior, Eliana Zandonade, Eneida Maria Souza Mendonça, Fátima Maria Silva, Gleice Pereira, Graziela Baptista Vidaurre, José André Lourenço, Marcelo Eduardo Vieira Segatto, Margarete Sacht Góes, Othon Souto Campos, Rogério Borges de Oliveira, Rosana Suemi Tokumaru, Sandra Soares Della Fonte

Secretaria do Conselho Editorial
Douglas Salomão

Administrativo
Josias Bravim, Washington Romão dos Santos

Seção de Edição e Revisão de Textos
Fernanda Scopel, George Vianna,
Jussara Rodrigues, Roberta Estefânia Soares

Seção de Design
Juliana Braga, Samira Bolonha Gomes

Seção de Livraria e Comercialização
Adriani Raimondi, Ana Paula Rubim,
Dominique Piazzarollo, Marcos de Alarcão,
Maria Augusta Postinghel

Produção Cultural
Déborah Pinto Corrêa

Este trabalho atende às determinações do Repositório Institucional do Sistema Integrado de Bibliotecas da Ufes e está licenciado sob a Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Preparação de texto
Roberta Estefânia Soares

Capa
Juliana Braga

Projeto gráfico
Samira Bolonha Gomes

Diagramação
Bruno Ferreira Nascimento (Graúna Digital)

Revisão de texto
Jussara Rodrigues

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Editora Universitária – Edufes, ES, Brasil)

C331t

Carvalho, Suzana Gonçalves.
Tratamento da leishmaniose cutânea canina [recurso eletrônico] : estudo com ciclodextrinas / Suzana Gonçalves Carvalho. - Dados eletrônicos. - Vitória, ES : Edufes, 2025.
106 p. : il. ; 23 cm. - (Coleção Prêmio Ufes de Teses e Dissertações; 4)

Inclui bibliografia.
ISBN: 978-85-7772-634-9
Publicado também em formato impresso.
Modo de acesso: https://repositorio.ufes.br/handle/10/774

1. Leishmaniose. 2. Ciclodextrinas. 3. Cães. 4. Farmacologia veterinária. I. Título. II. Série.

CDU: 619

Elaborado por Ana Paula de Souza Rubim – CRB-6 ES-000998/O

Esta obra foi composta com as famílias tipográficas
Barlow, Bitter e Crimson Text.

A PRIMEIRA EDIÇÃO DE UM PRÊMIO MUITO ESPECIAL

A Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes) e a sua editora têm a alegria de publicar as oito obras vencedoras da primeira edição do Prêmio Ufes de Teses e Dissertações, cujo objetivo foi premiar as melhores pesquisas de alunos de pós-graduação defendidas no quadriênio 2017-2020.

Foram contempladas obras de todas as Grandes Áreas existentes na Ufes: Ciências Agrárias; Ciências Humanas; Ciências da Saúde; Ciências Exatas e da Terra; Ciências Sociais Aplicadas; Engenharias; Linguística, Letras e Artes; e Multidisciplinar. A exceção ficou por conta da Grande Área de Ciências Biológicas, para a qual não houve indicação.

O processo de premiação se deu assim: cada programa participante indicou um trabalho de discente defendido entre 2017-2020, considerando os critérios de inovação, relevância e impacto; a seguir, foi constituída uma Comissão Julgadora, com docentes dos próprios programas de pós-graduação, que selecionou os trabalhos concorrentes; essa Comissão indicou, por fim, a dissertação ou tese vencedora. Entre as dezenas de programas da Ufes e entre as centenas de trabalhos defendidos no quadriênio, ter sua pesquisa contemplada como vencedora é, sem meias palavras, um feito.

Uma pesquisa não se faz da noite para o dia. Não é fruto de um acaso, nem de sorte. É um trabalho intenso de dedicação, de leituras, de *insights*, de cálculos, de engenhos, de reflexões, de criatividade, de organização. Embora haja cursos e livros

que nos auxiliam nas metodologias de pesquisa, o fato é que cada estudante acaba criando seu próprio método. E as áreas de saber, sendo tão diferentes, decerto produzem métodos também muito distintos. Uma leitura rápida dos títulos dos livros de imediato já dá a diversidade de interesses e caminhos dos – então – estudantes.

Desde o início, a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG), e em especial a Diretoria de Pós-Graduação (sob a condução da profa. Eliza Bartolozzi Ferreira), e a Edufes andaram de mãos dadas, cientes da importância deste Prêmio, cujo êxito praticamente exige sua continuidade.

Resta-nos parabenizar todos os autores, desejando que a pesquisa, agora em forma de livro, encontre os seus leitores. E isso decerto acontecerá, pois um feito desses – ter um estudo premiado entre tantos outros ao longo de longos quatro anos – é mesmo para atrair a atenção, a curiosidade, a leitura. E ter o livro lido é, sem dúvida, o maior dos prêmios.

Boa leitura!

Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro (Reitor – 2024-2028)
Sonia Lopes Victor (Vice-reitora – 2024-2028)

Paulo Sergio de Paula Vargas (Reitor – 2020-2024)
Roney Pignaton da Silva (Vice-reitor – 2020-2024)

Valdemar Lacerda Junior (Pró-reitor da PRPPG)

Wilberth Salgueiro (Diretor da Edufes)

PREMIADOS

Ciências Agrárias

Tratamento da leishmaniose cutânea canina: estudo com ciclodextrinas, de Suzana Gonçalves Carvalho

Ciências da Saúde

Hibridismo brincante: um estudo sobre as brincadeiras lúdico-agressivas na Educação Infantil, de Raquel Firmino Magalhães Barbosa

Ciências Exatas e da Terra

Voltametria aplicada ao controle de fármacos em fertilizantes orgânicos, de Luiz Ricardo Guterres e Silva

Ciências Humanas

Aprendizagem e desenvolvimento profissional de docentes de Educação Especial: estudo comparado sobre Brasil e Portugal, de Carline Santos Borges

Ciências Sociais Aplicadas

Lavagem de dinheiro e Hawala, de André Lovatti

Engenharias

Interação humano-máquina: reconhecendo e antecipando gestos e ações, de Clebeson Canuto

Linguística, Letras e Artes

Machado de Assis, poeta-tradutor, de Diego do Nascimento Rodrigues Flores

Multidisciplinar

Desenvolvimento de sinais em Libras para o ensino de Química Orgânica: um estudo de caso de uma escola de Linhares (ES), de Amanda Bobbio Pontara

“O que nos faz ser grandes é não perder o futuro de vista. O que nos movimenta é a 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

EDUFES
EDITORA

SUMÁRIO

Apresentação 13

Leishmaniose cutânea canina 17

Furazolidona 19

Complexos de inclusão com ciclodextrinas. 23

β-ciclodextrina 27

Hidroxipropil-β-ciclodextrina 31

Formação de complexos de inclusão furazolidona: ciclodextrinas. 35

Obtenção dos complexos 39

Análises térmicas e termogravimétricas 41

Difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura 57

Espectroscopia Raman. 65

RMN de ^{13}C no estado sólido 71

Avaliação biológica *in vitro* 79

Métodos de preparo e caracterização dos complexos de inclusão 83

Referências 91

Sobre a autora 101

Índice remissivo 103

Apresentação

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, os flebotomíneos (SASANI *et al.*, 2016). O espectro das formas clínicas pode variar em leishmaniose visceral, leishmaniose mucocutânea 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 (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, entre as quais se destacam: *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*, *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* e *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* (BRASIL, 2010; HEUSSER JÚNIOR *et al.*, 2010). No estado do Espírito Santo, os casos descritos de LCC devem-se, principalmente, a achados de *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* nos diagnósticos parasitológicos da doença (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, também, em decorrência da escassez de fármacos para uso exclusivo na farmacoterapia veterinária, uma vez que eles 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; REIMÃO; TANIWAKI; TEMPONE, 2010; TEMPONE *et al.*, 2010). Passos e colaboradores (2014) trataram cães naturalmente infectados por *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* com uma associação entre furazolidona (FZD) 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 e hepática e síndrome 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 a dissolução e biodisponibilidade deles e resultar na administração de doses mais baixas, contribuindo para a diminuição de possível toxicidade. 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 (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 relacionados ao seu uso. 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 (LYRA *et al.*, 2012).

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos capazes de formar complexos de inclusão (CIs) com inúmeros fármacos. Têm objetivos diversos, entre eles aumentar a solubilidade, melhorar a biodisponibilidade e incrementar a estabilidade (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; CHEIRSILP; RAKMAI, 2016). Outra vantagem da preparação de CIs é a possibilidade de mascarar o sabor desagradável e o odor de certos fármacos. Uma diversidade de métodos pode ser empregada no preparo de CIs, como a malaxagem e a liofilização (CHEIRSILP; RAKMAI, 2016). Esses métodos devem ser escolhidos de acordo com as características físico-químicas do fármaco e o tipo de ciclodextrina (CD) selecionada. 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, 2012b, 2012c).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo é aprimorar a solubilidade da FZD por meio da formação de CIs entre o fármaco e as CDs de interesse farmacêutico, com vistas a aumentar sua solubilidade e a 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, foram preparados complexos empregando a β-ciclodextrina e a hidroxipropil-β--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*.

EDUFES
EDITORA

Leishmaniose cutânea canina

A leishmaniose é uma doença infectoparasitária causada por parasitos do gênero *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, que acomete seres humanos e animais. É considerada, portanto, uma zoonose. Os parasitos causadores da leishmaniose vivem, alternadamente, em hospedeiros vertebrados e flebotomíneos (subfamília *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 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, a mucocutânea e a cutânea, também conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA). De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em 2016, o Brasil foi o país da América do Sul com maior número de novos casos de leishmaniose em humanos (12.690). Desses casos, 94 % eram da forma cutânea (LEISHMANIOSES, 2018, p. 2-3).

As formas de leishmaniose que podem acometer os cães são: visceral e cutânea. A forma sintomática da LCC acomete a pele e as mucosas dos animais. Os principais sintomas que eles apresentam são lesões cutâneas ulceradas na bolsa escrotal, nas orelhas, nos membros e no 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 emprego de produtos contendo agentes químicos eficazes. A manutenção da limpeza do hábitat 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).

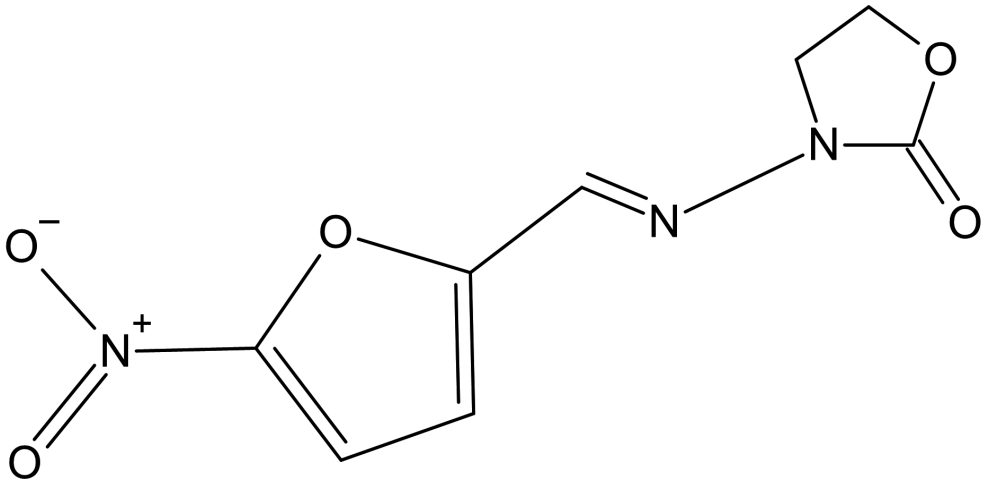
Do ponto de vista farmacológico, não existem medicamentos indicados para o tratamento da LCC no Brasil, uma vez que, segundo a legislação brasileira, medicamentos contendo fármacos destinados ao tratamento das leishmanioses em humanos não podem ser administrados nos animais, tendo em vista a possibilidade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

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 eles apresentaram eficácia antileishmania aumentada depois de incorporados em formas farmacêuticas micro e nanoparticuladas. A furazolidona é objeto deste estudo porque ela não é utilizada em humanos para o tratamento das leishmanioses e porque existem relatos do emprego dela visando a ação leishmanicida (CARVALHO *et al.*, 2018, 2020b).

Furazolidona

A furazolidona (FZD) é um derivado sintético de um grupo de compostos denominados nitrofuranos. Ela é 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 é um pó amarelo, cristalino, inodoro e com sabor amargo. Sua solubilidade em água é limitada, sendo considerada 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 e 7 em solução, enquanto o ponto de fusão dela é de 275 °C. O fármaco é fotossensível, ou seja, deve ser armazenado ao abrigo da luz, pois pode sofrer degradação se receber iluminação solar direta (SWEETMAN, 2009; UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2011).

Figura 1: Estrutura química da furazolidona



Fonte: Arquivo pessoal.

Na terapêutica veterinária, a FZD é indicada como endoparasiticida para uso no tratamento da giardiase, tricomoníase e histomoníase em cães e gatos, na dose usual de 4 mg/kg, não sendo, contudo, o fármaco de primeira escolha. Apesar de o 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 β-hidroxietilhidrazina, principalmente, e dióxido de carbono e etileno também parece estar associada 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 com meia-vida de eliminação de cinco horas. O fármaco é amplamente distribuído e extensivamente metabolizado, com excreção predominante na urina, com pequena quantidade do fármaco encontrado na forma inalterada. A eliminação do fármaco ocorre após a metabolização por associação com a glutationa. O principal problema associado ao seu uso em animais é a toxicidade renal, cardíaca e hepática

relatada, acompanhada 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 *et al.*, 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 reinfectados por *Helycobacter pylori* a 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 retratamento 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, entre 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 (1988) 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 médios de concentração inibitória (IC_{50})

variando de 0,47 μg/mL a 0,73 μg/mL. Tempone e colaboradores (2010) administraram FZD em sua forma lipossômica e livre em hamsters infectados com *L. (Leishmania) chagasi* e observaram que a FZD lipossomal foi aproximadamente cem vezes mais ativa e efetiva para matar as formas amastigotas dos parasitas que o fármaco livre. Já Passos e colaboradores (2014) trataram cães infectados com *L.* (Viannia) *braziliensis* juntamente com FZD e domperidona. Eles observaram que a terapia foi eficaz para o tratamento de LCC. Encorajados por esses resultados, nosso grupo de pesquisa preparou complexos furazolidona:β-ciclodextrina (FZD:β-CD), que apresentaram atividade leishmanicida significativa contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, com valores IC_{50} de 6,16 μg/mL e 1,83 μg/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 testada (CARVALHO *et al.*, 2018, 2020b).

No Brasil, a furazolidona teve seu uso proibido em animais destinados à produção de alimentos. Essa vedação consta na Portaria nº 448, de 1998, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

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 a dados da dissolução dos fármacos *in vitro*, o delineamento racional de formulações destinadas ao uso oral é favorecido (AMIDON; SHAH, 1995; WAGH; PATEL, 2010). 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 (WAGH; PATEL, 2010). 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 existem, 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 intencionados 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. Artifícios farmacotécnicos usualmente empregados são a diminuição da granulometria de partículas ao tamanho micrométrico, a formação de dispersões sólidas, a preparação de cocristais, a formação de micelas poliméricas, a obtenção de sistemas micro e nanoparticulados e a formação de complexos a partir de excipientes (CARVALHO *et al.*, 2020a, 2021; KRISHNAIAH, 2010; PAWAR ANIL; CHOUDHARI PRAVIN, 2012; PRAKASH *et al.*, 2014; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Entre os excipientes empregados para incrementar a solubilidade, destacam-se as CDs, moléculas denominadas hospedeiras com as quais moléculas hóspedes se associam formando os CIs (PRAKASH *et al.*, 2014). A principal vantagem do uso da CD quando comparada com outros cossolventes e surfactantes é que, no primeiro caso, o fármaco permanecerá em solução independentemente de alterações que possam ocorrer no sistema, como a diluição ou adição de solvente (JAMBHEKAR; BREEN, 2016). Aliado ao interesse do aumento da solubilidade do fármaco, é frequentemente relatado 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 CDs pode, mediante aumento da solubilidade e/ou diminuição da permeabilidade, favorecer a diminuição da toxicidade (LYRA *et al.*, 2012).

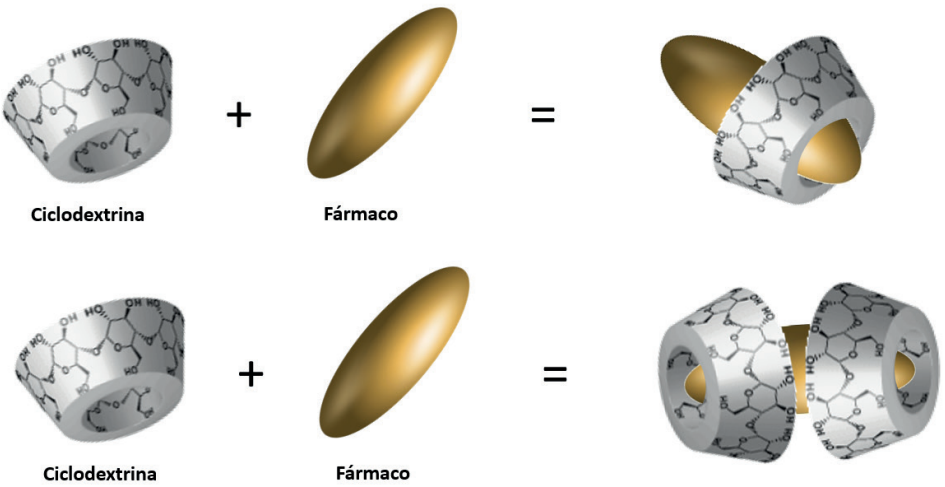
As CDs são oligossacarídeos cíclicos formados a partir da digestão bacteriana da celulose pela ação da enzima amilase ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase), proveniente do *Bacillus macerans*. Elas se apresentam como cones truncados devido à conformação assumida pelas unidades de α-*D*-glicopiranose (α-1,4), que se unem em sete, oito ou nove unidades para dar origem à α, β e γ-ciclodextrina, respectivamente, as CDs naturais de maior interesse na área farmacêutica.

Cada unidade de glicopiranose possui três 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 útil no preparo de CIs (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON *et al.*, 2005).

A formação de CIs com as CDs desperta o interesse pela realização de estudos em diversas áreas, tais como 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, do sabor e da cor; (v) modificar a reatividade química das substâncias incluídas; (vi) fixar fármacos voláteis; (vii) controlar a liberação de fármacos (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON *et al.*, 2005).

Uma das características da CD 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, governa 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 β-CD deve possuir massa molar compreendida entre 100 e 400 Daltons.

Figura 2: Representação esquemática da formação de complexos fármacos: CD nas razões molares 1:1 e 1:2



Fonte: Adaptado de Davis e Brewster (2004).

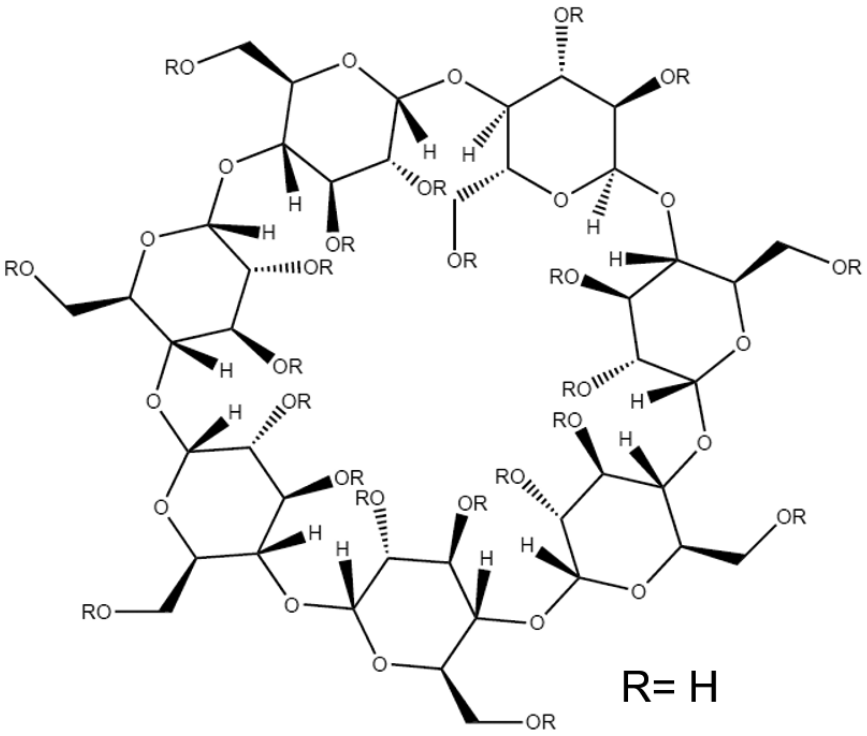
Apesar do relato de trabalhos que empregam outras razões molares fármaco:CD, como 1:3 e 1:4, é importante que seja empregada a menor concentração possível do excipiente, uma vez que proporções maiores inviabilizariam o preparo de qualquer forma farmacêutica (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

As principais CDs naturais estudadas são a α, a β e a γ-ciclodextrina. A β-ciclodextrina é amplamente utilizada em CIs devido ao tamanho da sua cavidade, à eficiência na complexação e ao preço relativamente baixo. Derivados semissintéticos também têm sido explorados, tais como a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, o sal sódico de sulfobutiléter-β-ciclodextrina, a β-ciclodextrina metilada randômica e a 2-hidroxipropil-γ-ciclodextrina. A 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina destaca-se em CIs devido à sua solubilidade (RAJPUT; PATEL; TRIVEDI, 2016).

β-ciclodextrina

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

Figura 3: Estrutura molecular da β-CD



Fonte: Arquivo pessoal.

A β-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 β-CD, as principais vantagens associadas ao seu uso são o diâmetro (6,0 a 6,5 Å) e o volume da cavidade hidrofóbica (262 Å), o que lhe confere boa capacidade de inclusão, baixa toxicidade relatada relacionada ao seu uso e menor preço quando comparado ao das demais CDs (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

A respeito da preparação de medicamentos baseados na β-CD, Demicheli e colaboradores (2004) prepararam CIs entre β-CD e antimoniato de meglumina (AntM) 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 AntM. Segundo os autores, os

dados mostraram 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:β-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:β-CD (1:2) preparado por coevaporação para avaliar a utilidade dele em reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia 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:β-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.

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

Estudos envolvendo a complexação do piroxicam com a β-CD comprovaram a eficiência do CI em melhorar a biodisponibilidade do fármaco e demonstraram a redução dos efeitos irritantes que ele tem sobre a mucosa gastrointestinal (SCARPIGNATO, 2013). Dharmasthala e colaboradores (2019) prepararam filmes orais de dispersão rápida contendo o complexo piroxicam:β-CD com vistas a 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 pode ser considerada promissora.

Mendes e colaboradores (2016) produziram CIs entre a β-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 β-CD foi considerado promissor.

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

Quadro 1: Medicamentos disponíveis no mercado nacional e internacional preparados a partir de fármacos complexados com a β-CD

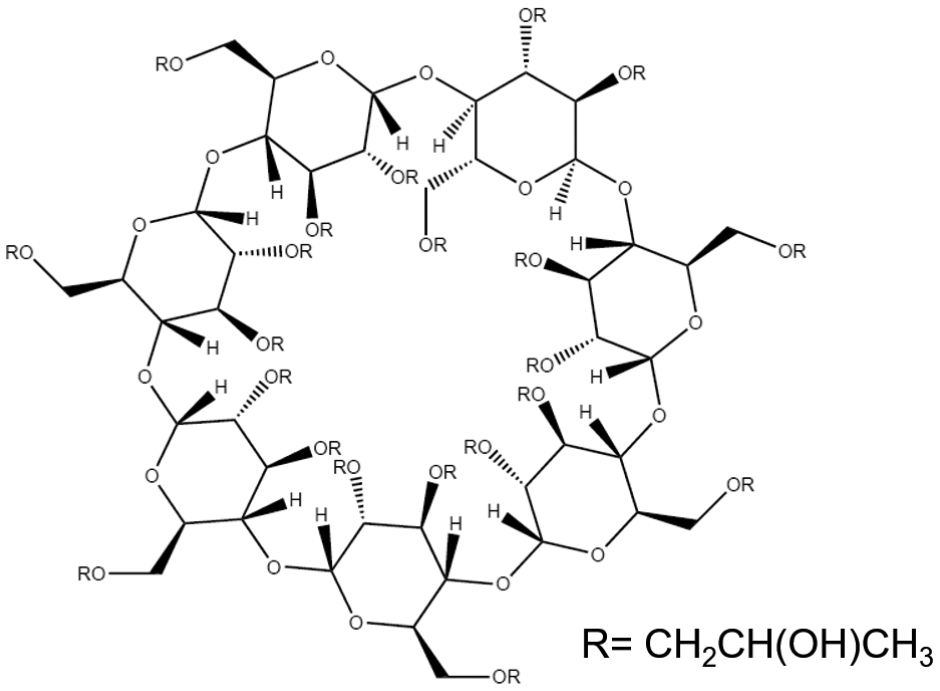
Fármaco	**Nome comercial**	**Forma farmacêutica**	**Laboratório**	**Indicação**
difenidramina	Stada-Travel®	Comprimido mastigável	Stada	Antiemético
dexametasona	Glymesason®	Creme	Fujinaga	Analgésico
minoxidil	Alopexy®	Solução	Pierre Fabre	Hipertensão
metronidazol	Nidagel®	Gel vaginal	Tolmar	Antiparasitário
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

Fonte: Cunha-Filho e Sá-Barreto (2007), Guedes e outros (2008) e Oliveira, Santos e Coelho (2009).

Hidroxipropil-β-ciclodextrina

A 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) é uma CD sintética, obtida por modificação química da β-CD mediante substituição do H pelo grupo $-CH_2CHOHCH_3$. A representação da sua estrutura química é dada na Figura 4. A HP-β-CD possui massa molar de 1400 g/mol e apresenta maior solubilidade em água que a β-CD (> 600 mg/mL, a 25 °C), sendo esta a principal vantagem associada ao seu uso (JAMBHEKAR; BREEN, 2016). Estudos apontam que a HP-β-CD possui baixa toxicidade e é bem tolerada por animais (GOULD; SCOTT, 2005).

Figura 4: Estrutura molecular da HP-β-CD



Fonte: Arquivo pessoal.

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

Wen e colaboradores (2010) prepararam complexos naringenina:HP-β-CD em diferentes razões molares (1:1, 1:2, 1:3 e 1:4). Os resultados das análises da solubilidade por cromatografia líquida de alto desempenho mostram que a solubilidade do flavonoide aumentou de 4,38 μg/mL para 1272,31 μg/mL.

Domańska, Pelczarska e Pobudkowska (2011) prepararam CIs entre a HP-β--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-β-CD na razão molar 1:1 pelo método de *spray-drier*. Os estudos de dissolução demonstraram que a porcentagem de dissolução foi aumentada quando comparada ao fármaco puro.

Resultados semelhantes foram obtidos por Vlachou e Papaiöannou (2003), que prepararam complexos entre a HP-β-CD e a furosemida, um diurético amplamente prescrito.

Yang e colaboradores (2017) obtiveram CIs entre o tamibaroteno e a HP-β-CD. Eles 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 CIs entre a artemisina e a HP-β-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 para o fármaco livre a porcentagem liberada foi de 18 %.

Zhang e colaboradores (2018) prepararam CIs toltrazuril:HP-β-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-β-CD, estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2: Medicamentos disponíveis no mercado nacional e internacional preparados a partir de fármacos complexados com a HP-β-CD

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

Fonte: Cunha-Filho e Sá-Barreto (2007), Guedes e outros (2008) e Oliveira, Santos e Coelho (2009).

EDUFES
EDITORA

Formação de complexos de inclusão furazolidona: ciclodextrinas

A LCC é um problema veterinário significativo em todo o mundo. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e os animais infectados atuam como reservatórios dos parasitos, contribuindo para a transmissão da doença para os humanos (SASANI *et al.*, 2016).

O uso da FZD no tratamento da leishmaniose tem sido descrito por diversos autores que testaram a atividade leishmanicida do fármaco puro, associado ou incorporado em lipossomas sob formas promastigotas e amastigotas de diferentes cepas de Leishmania, tais como *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis* (BERMAN; LEE, 1983; NEAL; BUEREN; HOOPER, 1988; REIMÃO; TANIWAKI; TEMPONE, 2010; TEMPONE *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2018).

Passos e colaboradores (2014) relataram, durante o tratamento de oito cães infectados por *L. braziliensis* com uma associação entre furazolidona (35 mg/kg/dia) e domperidona (1 mg/kg/12h), que a terapêutica foi efetiva para o tratamento das lesões, que foram reepitalizadas em 93 dias. No entanto, os autores observaram que o tratamento com a FZD causou reações adversas nos animais, como anorexia, perda de peso, fadiga e perda da coordenação motora, que podem estar relacionadas à dose elevada do fármaco (ALAM; PAGET; ELKORDY, 2016).

Assim, aprimorar a solubilidade da FZD através da formação de CIs com CDs de interesse farmacêutico é uma estratégia farmacotécnica que pode aumentar a taxa de dissolução e incrementar sua biodisponibilidade, reduzindo a toxicidade do fármaco, mediante a possibilidade de administração de doses menores. Além disso, o aumento da solubilidade visa favorecer a preparação de formas farmacêuticas orais líquidas, o que pode aumentar a adesão dos animais ao tratamento (CORRÊA *et al.*, 2005; LYRA *et al.*, 2012; JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

As CDs são compostas de unidades α-D-glicopiranose, produzidas durante o processo de degradação do amido (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Cada unidade de α-D-glicopiranose possui três 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 CIs com fármacos de alta lipossolubilidade (LOFTSSON *et al.*, 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Entre as inúmeras CDs de interesse disponíveis comercialmente destacam-se a β-CD e a HP-β-CD. Além da origem natural, a β-CD tem boa capacidade de inclusão, baixa toxicidade e menor preço. Já a HP-β-CD possui baixa toxicidade e é bem tolerada em animais (GOULD; SCOTT, 2005).

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 do tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura. As técnicas termoanalíticas mais empregadas para estudar a complexação com CDs são a calorimetria exploratória diferencial (DSC), a termogravimetria (TG) e a termogravimetria diferencial (DTG) (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; SINGH *et al.*, 2010; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012a).

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, entre elas a solubilidade com consequente modificação da biodisponibilidade (AGUIAR; GEMAL; SAN GIL, 1999). Informações estruturais sobre CIs podem ser

obtidas, principalmente, a partir de análises combinadas dos métodos de difração de raios X (DRX), espectroscopia Raman e técnicas de RMN de ^{13}C no estado sólido. Genericamente, tais métodos proveem 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; VOGT; STROHMEIER, 2012).

A complexação da FZD com CDs de interesse farmacêutico, notadamente a β-CD e a HP-β-CD, aumenta a solubilidade do fármaco, melhora a biodisponibilidade dele e reduz a dose a ser administrada, com consequente diminuição da toxicidade. Para tanto, foram utilizados métodos baseados em análises térmicas (DSC e TG) e técnicas capazes de promover alterações de cristalinidade nos complexos, como a DRX, a ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido e a espectroscopia Raman. Os métodos que avaliam alterações na cristalinidade se mostram úteis para detectar a existência de alterações de sinais pertinentes nos complexos quando comparados com aqueles observados nos difratogramas e nos espectros dos materiais de partida e das misturas físicas. Alterações na cristalinidade observadas nos compostos são, por sua vez, indicativos não somente do sucesso da complexação, mas, também, da ocorrência da modificação das propriedades físico-químicas aparentes das moléculas hospedadas na cavidade das CDs. Substâncias que apresentam diferentes organizações de suas estruturas cristalinas possuem diferentes propriedades, entre as quais a solubilidade e a estabilidade (AGUIAR; GEMAL; SAN GIL, 1999). Finalmente, a citotoxicidade dos compostos em linhagens de macrófagos THP-1 e a atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram pesquisadas empregando métodos *in vitro*.

EDUFES
EDITORA

Obtenção dos complexos

Os complexos foram preparados pelos métodos de malaxagem e liofilização, empregando furazolidona (225,6 mg), β-CD (1135 ou 2270 mg) e HP-β-CD (1460 ou 2920 mg) nas razões molares 1:1 e 1:2 (fármaco:CD).

Pela técnica de malaxagem, uma solução aquosa de etanol a 75 % v/v[1] foi adicionada lentamente sobre as misturas FZD:CDs, até a obtenção de uma massa pastosa, que foi mantida sob agitação magnética durante seis horas. Um pequeno volume de solução hidroalcóolica foi adicionado ocasionalmente, mantendo a mistura com consistência pastosa, passível de ser malaxada. Os produtos obtidos foram secados em temperatura ambiente.

Na liofilização, as CDs foram inicialmente solubilizadas em solução aquosa de etanol a 75 % v/v, e, a essa solução, a FZD foi adicionada. As misturas foram mantidas sob agitação em banho reciprocante a 35 °C, durante o período de 48 horas. A suspensão assim obtida foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 97 horas, sob pressão de 79 μHg a -56 °C. Misturas físicas entre a FZD e as CDs foram preparadas, nas mesmas razões molares, por mistura simples, empregando gral e pistilo.

Conforme Veiga, Pecorelli e Ribeiro (2006), as relações estequiométricas mais usuais para a formação de complexos são 1:1 e 1:2. Apesar do relato de trabalhos que empregam outras razões molares fármaco:CD (1:3, 1:4, 2:1, entre outras), é importante destacar que sempre deve ser utilizada a menor concentração possível de CDs,

1 volume de soluto/volume de solução.

uma vez que o requerimento de proporções maiores da molécula hóspede denota menor eficiência de complexação e inviabiliza o preparo de qualquer forma farmacêutica, já que o volume de matéria-prima a ser utilizado será elevado (JAMBHEKAR; BREEN, 2016). Tais observações justificam o interesse no preparo de CIs nas razões 1:1 e 1:2. As moléculas hóspedes a serem complexadas devem possuir massa molar compreendida entre 100 e 400 Daltons. Uma vez que a massa molar da FZD é de 225,16 g/mol e que sua solubilidade em água é baixa (40 mg/L), o fármaco se mostra um bom candidato para a complexação.

Existem inúmeros trabalhos na literatura que relatam a preparação de CIs baseada em fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, inclusive leishmanioses, com objetivos diversos, entre os quais, aumentar a solubilidade dos fármacos, incrementar a taxa de dissolução, melhorar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e viabilizar o preparo de soluções orais e, principalmente, parenterais. Demicheli e colaboradores (2004) prepararam CIs entre a β-CD e o AntM em diferentes proporções molares através do método de liofilização e estudaram a atividade leishmanicida dos complexos empregando animais infectados por *L. amazonensis*. Segundo os autores, os dados mostraram claramente a relação estabelecida entre a complexação e a melhor biodisponibilidade do AntM pela via oral. Frézard e colaboradores (2008) observaram que o complexo AntM:β-CD preparado 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. Lopes e colaboradores (2011) avaliaram a citotoxicidade e os efeitos tripanomicidas do complexo metronidazol:β-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 tripanomicida e toxicidade em células de mamíferos. No entanto, a complexação via inclusão aumentou a solubilidade do fármaco em água em 1,7 vezes. Soares Sobrinho e colaboradores (2011) prepararam CIs entre o benznidazol e a β-CD e perceberam o aumento da solubilidade e melhoria drástica na taxa de dissolução do fármaco após a formação dos CIs. Em um trabalho prévio, nosso grupo preparou complexos FZD:β-CD na razão 2:1 por malaxagem e liofilização e obteve resultados promissores, especialmente para os complexos obtidos por liofilização (CARVALHO *et al.*, 2018).

Análises térmicas e termogravimétricas

Para avaliar os eventos térmicos ocorridos nos materiais, curvas de DSC foram obtidas utilizando calorímetro, 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 e DTG foram obtidos em termobalança, em atmosfera de nitrogênio, razão de fluxo de 50 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C/min, entre 25 e 800 °C.

DSC, TG e DTG são os métodos térmicos mais comumente empregados para avaliar a formação de CIs com CDs (SINGH *et al.*, 2010; TAKAHASHI, VEIGA; FERRAZ, 2012b).

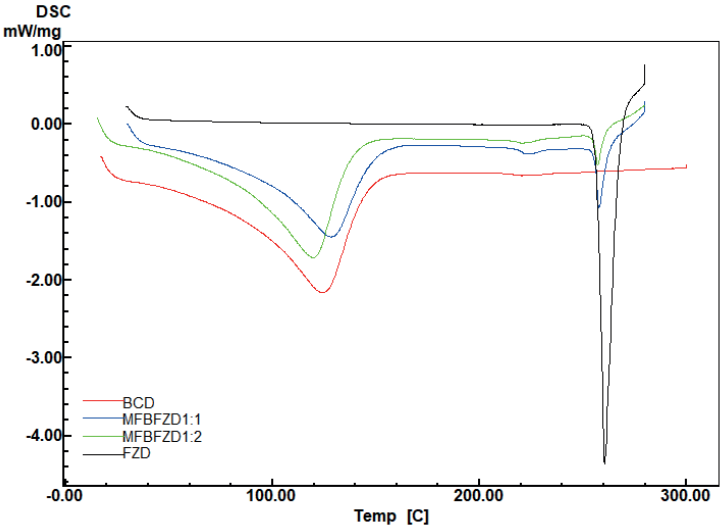
Pelo método de DSC, é analisada a existência de alterações nos perfis termoanalíticos dos complexos quando comparados aos dos materiais de partida puros e das misturas físicas, com supressão de eventos tais como fusão e termodecomposição (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012b). A análise das curvas de DSC da β-CD e da HP-β-CD permite observar a existência de endotermas relacionadas à saída da água livre da cavidade das moléculas hospedeiras em temperatura máxima de 123,9 °C e 99,6 °C, respectivamente. Tais achados estão em conformidade com a literatura (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). Já a curva DSC da FZD livre apresenta uma única endoterma, em temperatura máxima de 260,4 °C, relacionada à fusão do fármaco. Marian e colaboradores (2013) relataram a ocorrência de fusão da FZD em temperatura de 258 °C, com o início da decomposição térmica em temperatura acima 275 °C. Os autores relataram ainda que a ausência

de eventos relativos à perda de água na curva DSC do fármaco se deve à hidrofobicidade da molécula. As curvas de DSC podem ser vistas nas figuras 5 e 6.

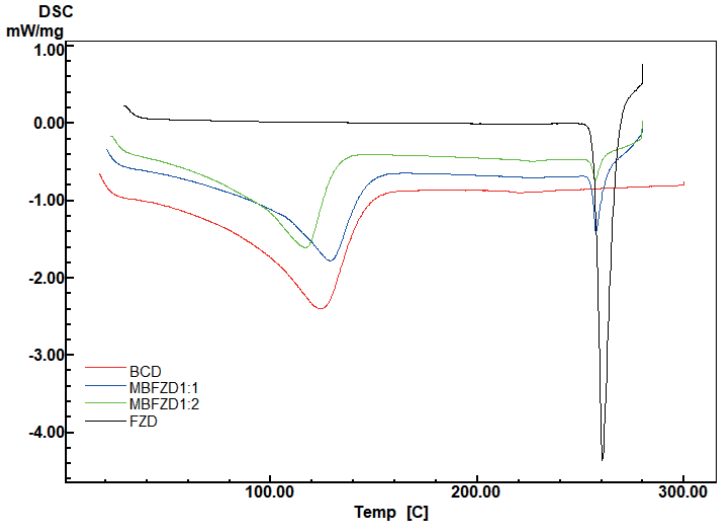
As curvas DSC das misturas físicas preparadas a partir da β-CD podem ser consideradas como originárias das contribuições dos materiais de partida, com a presença das endotermas de desidratação da CD e de fusão do fármaco, em temperaturas próximas às observadas para os materiais de partida. Nas curvas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

Figura 5: 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 β-CD

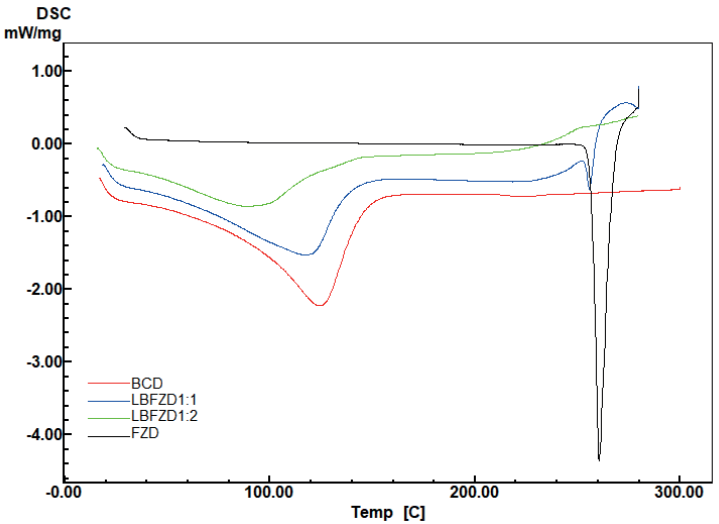
a) misturas físicas



b) complexos obtidos por malaxagem



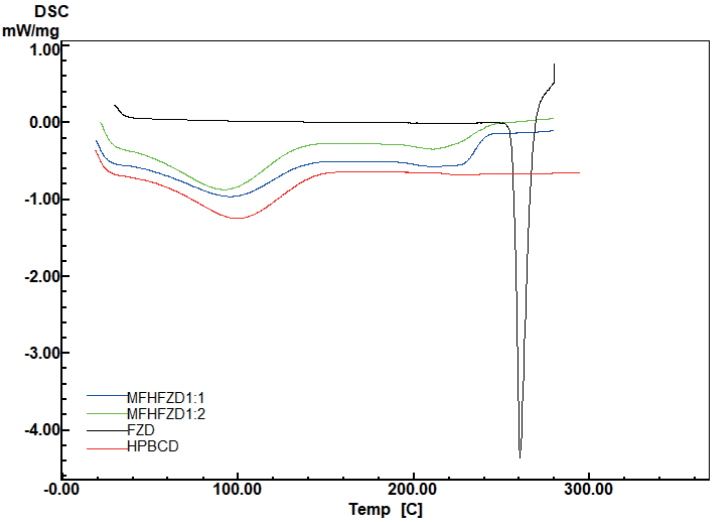
c) complexos preparados por liofilização



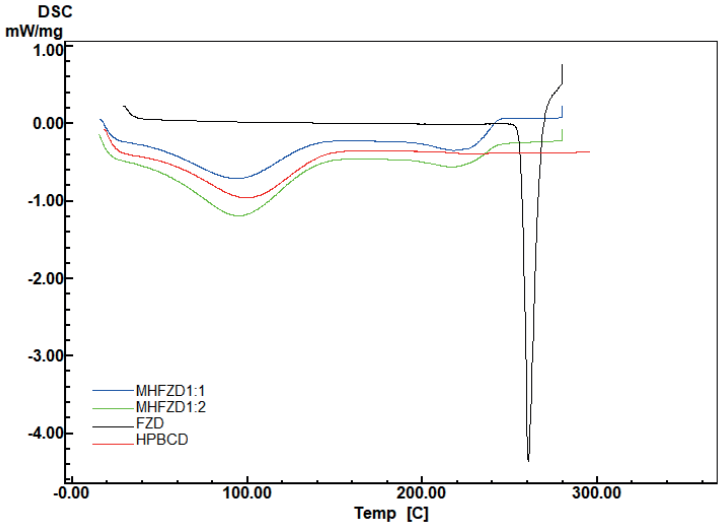
Fonte: Elaboração própria.

Figura 6: 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-β-CD

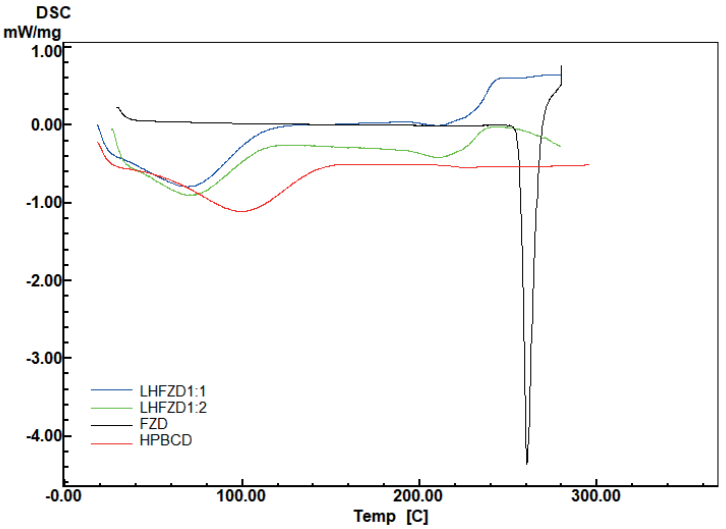
a) misturas físicas



b) complexos obtidos por malaxagem



c) complexos preparados por liofilização



Fonte: Elaboração própria.

As curvas de DSC das misturas físicas obtidas a partir da HP-β-CD, em ambas as razões molares, apresentaram perfil semelhante àquelas observadas para a β-CD, podendo ser consideradas como sobreposições das curvas dos materiais de partida. Para os compostos FZD:HP-β-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 a 210 °C. Tais achados sugerem a existência de interações entre as moléculas. As maiores modificações foram vistas para os complexos FZD:HP-β-CD obtidos por liofilização: houve reduções tanto nas temperaturas relacionadas ao evento de perda de água quanto nos eventos relativos à fusão do fármaco, sugerindo a formação dos complexos. Quando ocorre a formação do complexo, espera-se que o pico de fusão do fármaco desapareça ou seja deslocado para temperaturas superiores. No entanto, segundo alguns autores, pode-se observar também, consoante o tipo de interações existentes entre as moléculas, modificações nas temperaturas de fusão para valores inferiores ao observado para o fármaco puro (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). Na Tabela 1 são apresentados os dados de energia envolvida nos eventos térmicos de DSC.

Tabela 1: Variação de entalpia (ΔH), temperatura inicial (T_{on}), temperatura final (T_{end}) e temperatura máxima (T_{peak}) de ocorrência dos eventos térmicos observados por DSC até 280 °C, em atmosfera de argônio

	ΔH (J/g)	Temperatura (°C)			ΔH (J/g)	Temperatura (°C)		
	Perda de H_2O	T_{on}	T_{end}	T_{peak}	Fusão	T_{on}	T_{end}	T_{peak}
Materiais de partida								
FZD	ND	ND	ND	ND	141,1	252,0	270,0	260,4
β-CD	480,7	21,3	163,0	123,9	ND	ND	ND	ND
HP-β-CD	189,3	31,4	153,6	99,3	ND	ND	ND	ND
Misturas físicas								
MFBFZD1 :1	300,2	37,4	164,0	128,3	16,1	250,7	264,0	257,7
MFBFZD1:2	396,2	22,6	154,6	119,6	6,7	250,9	262,2	256,9
MFHFZD1 :1	132,2	36,5	147,6	95,5	7,9	191,4	231,4	211,3
MFHFZD1:2	185,0	29,9	142,4	91,6	8,0	191,8	228,4	210,9
Complexos FZD:β-CD								
MBFZD1:1	260,2	43,7	160,2	128,8	16,7	252,2	265,0	257,5
MBFZD1:2	279,8	31,7	142,3	116,8	5,3	251,1	261,0	257,1
LBFZD1:1	364,1	26,3	151,1	117,4	6,0	255,8	259,0	255,9
LBFZD1:2	213,9	24,8	143,0	88,7	ND	ND	ND	ND
Complexos FZD:HP-β-CD								
MHFZD1:1	144,1	37,5	143,6	93,1	12,5	193,6	233,5	217,4
MHFZD1:2	180,0	31,0	146,2	94,6	11,7	193,8	234,0	216,9
LHFZD1:1	202,6	20,2	104,4	68,4	4,0	196,7	223,4	209,7
LHFZD1:2	167,6	30,3	112,4	71,0	7,0	193,3	224,2	211,2

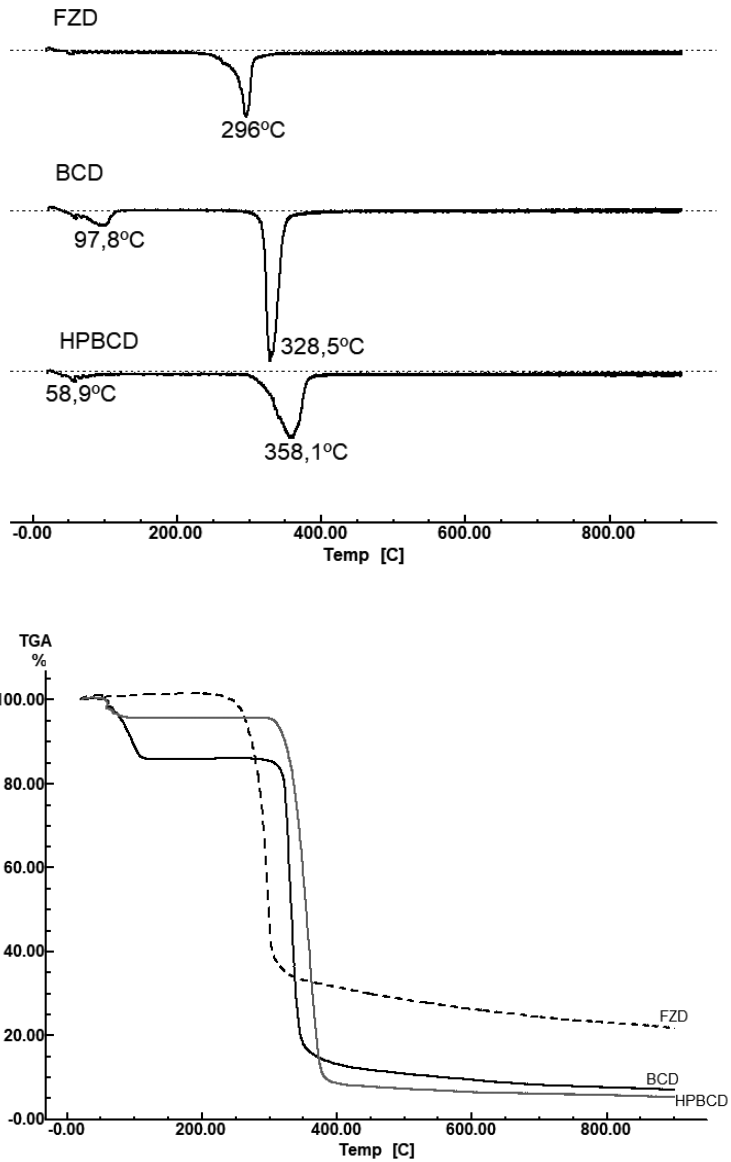
ND: evento não detectado.

Fonte: Elaboração própria.

Por meio das análises TG/DTG, dois parâmetros principais que evidenciam a formação de complexos são observados. O primeiro é relativo a alterações na porcentagem da massa inicial perdida pelos complexos quando comparadas com as da CD pura e da MF, relacionada à perda de água, que ocorre entre 90 e 150 °C. Quando ocorre a complexação, a porcentagem de água perdida é diminuída, sugerindo que a água foi deslocada do interior da cavidade para dar lugar à molécula hóspede. O segundo se refere ao aumento da temperatura de degradação observada para a molécula hóspede, pois presume-se que ela estará protegida da degradação quando complexada (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012b).

As figuras 7, 8 e 9 apresentam os termogramas dos materiais de partida e dos CIs preparados a partir da β-CD e da HP-β-CD. Nos termogramas das matérias-primas, picos referentes às endotermadas, bem definidos, podem ser visualizados.

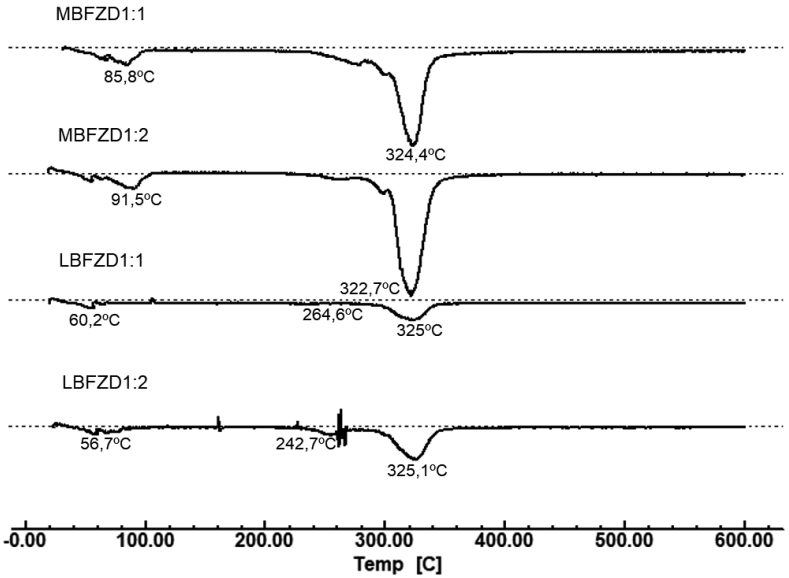
Figura 7: Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de N_2 (50 mL min^{-1}; 10 °C/min), entre 25 e 800 °C, das amostras FZD, β-CD e HP-β-CD

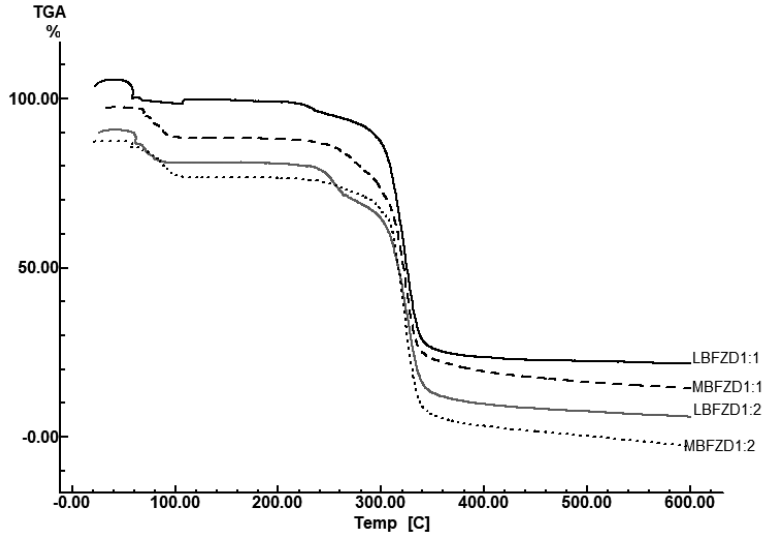


Fonte: Elaboração própria.

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

Figura 8: Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de N_2 (50 mL min^{-1}; 10 °C/min), entre 25 e 800 °C, das amostras preparadas a partir da β-CD



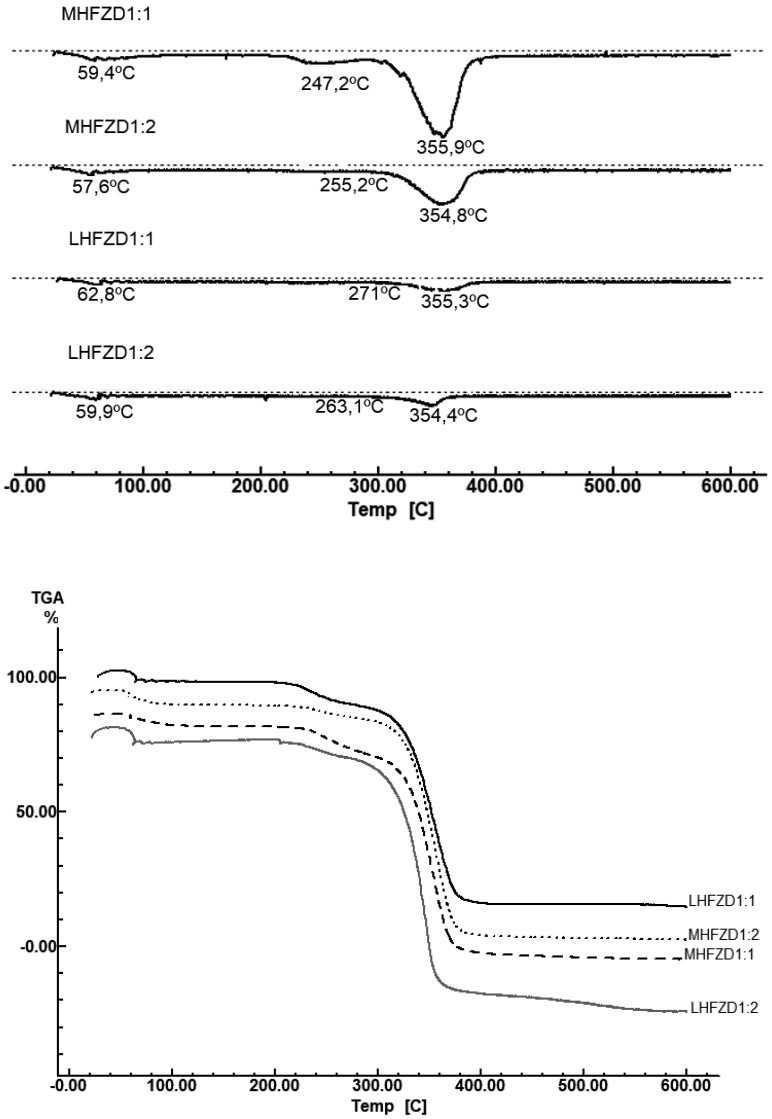


Fonte: Elaboração própria.

Para as misturas físicas FZD:β-CD, pequenas reduções nas perdas de massa ocorreram para as razões molares 1:1 (10,6 %; $T_{máxima}$ = 89,5 °C) e 1:2 (11,4 %; $T_{máxima}$ = 91,3 °C). Já os eventos de decomposição térmica foram detectados em temperaturas próximas a 325 °C. A Tabela 2 traz os resultados de perda de massa (%) das amostras, e as temperaturas aproximadas dos eventos são mostradas entre parênteses.

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

Figura 9: Termogramas TG/DTG obtidos em atmosfera de N_2 (50 mL min^{-1}; 10 °C/min), entre 25 e 800 °C, dos produtos preparados a partir da HP-β-CD



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2: Perda de peso (%) relativa às CDs, misturas físicas e complexos obtidos por termogravimetria

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

Fonte: Elaboração própria.

Nota: Temperaturas aproximadas de eventos são mostradas entre parênteses.

Semelhante ao observado para a β-CD, os termogramas FZD:HP-β-CD das misturas físicas 1:1 e 1:2 apresentaram similaridade, com pequena redução da perda de água por desidratação, para ambas as razões molares estudadas: 4,2 % (1:1) e 4,3 % (1:2) (Tabela 2). Para os complexos FZD:HP-β-CD preparados por malaxagem, a diminuição da massa relativa à perda de água foi semelhante à das misturas físicas: 4,3 % (1:1) e 4,6 % (1:2). Já para os complexos FZD:HP-β-CD por liofilização, as perdas de massa foram 3,3 % ($T_{máxima}$ = 62,8 °C) e 4,2 % ($T_{máxima}$ = 59,9 °C) para as razões molares 1:1 e 1:2, respectivamente. Em todos os termogramas, podem ser vistos outros dois eventos, com a primeira endoterma em temperaturas inferiores a 272 °C, referentes à decomposição térmica do fármaco, e, próximas a 355 °C, relativas à degradação da HP-β-CD. Os menores valores relativos à perda de água e redução na temperatura de fusão do fármaco podem ser vistos para os produtos preparados por liofilização.

EDUFES
EDITORA

Difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura

Os difratogramas de raios X foram obtidos em difratômetro, empregando radiação CuKα (λ = 1,5418 Å) 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.

A morfologia das partículas foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O material foi metalizado com ouro (20 mPA, 120s), em metalizador DESK V. Fotomicrografias foram obtidas com tensão de excitação de 20 keV, em diferentes ampliações.

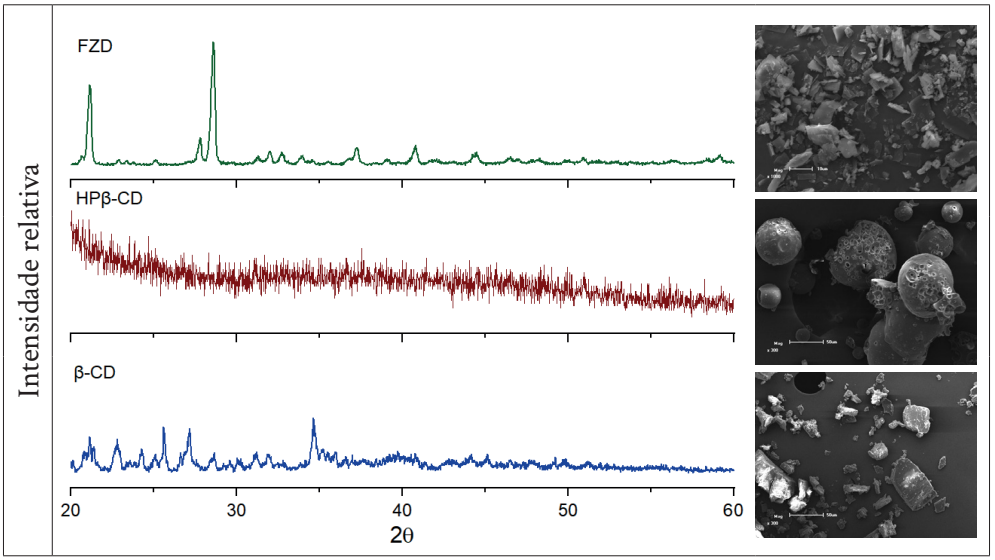
O uso de métodos que avaliam a modificação da forma cristalina, no contexto da preparação de CIs com CDs, é de grande interesse, pois alterações na cristalinidade dos compostos levam a mudanças nas propriedades físico-químicas, especialmente na solubilidade dos fármacos.

A DRX é um método cristalográfico rápido e de fácil execução, capaz de detectar alterações na estrutura cristalina dos compostos, a partir da medida da intensidade de raios X difratados, incididos sob determinados ângulos, sobre as amostras sólidas. Algumas CDs em estado cristalino formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, estabilizando tanto a conformação da molécula como a estrutura cristalina e gerando difratogramas com picos bem definidos (RAOOV; MOHAMAD; ABAS, 2014). Assim, o sucesso da complexação é confirmado mediante comparação dos

difratogramas dos materiais de partida, das misturas físicas e dos complexos, observando-se o surgimento ou desaparecimento de picos, bem como alterações de intensidade.

Nos difratogramas da FZD e da β-CD podem ser vistos inúmeros picos máximos de reflexão, o que sugere que ambas apresentam perfil difratométrico de compostos cristalinos, ao contrário do observado para a HP-β-CD, característico de substâncias amorfas. Os perfis difratométricos das CDs estão em conformidade com a literatura (DANG *et al.*, 2011; MARTINS; CALDERINI; PESSINI, 2012). Os perfis difratométricos encontrados estão em conformidade também com as fotomicrografias obtidas para os materiais de partida (Figura 10). É possível observar que a β-CD se apresenta como cristais cúbicos enquanto a FZD se apresenta na forma de lâminas regulares. Já a HP-β-CD pode ser vista na forma amorfa. Os difratogramas e as fotomicrografias por MEV dos materiais de partida são dados na Figura 10.

Figura 10: Difratogramas de raios X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) dos materiais de partida

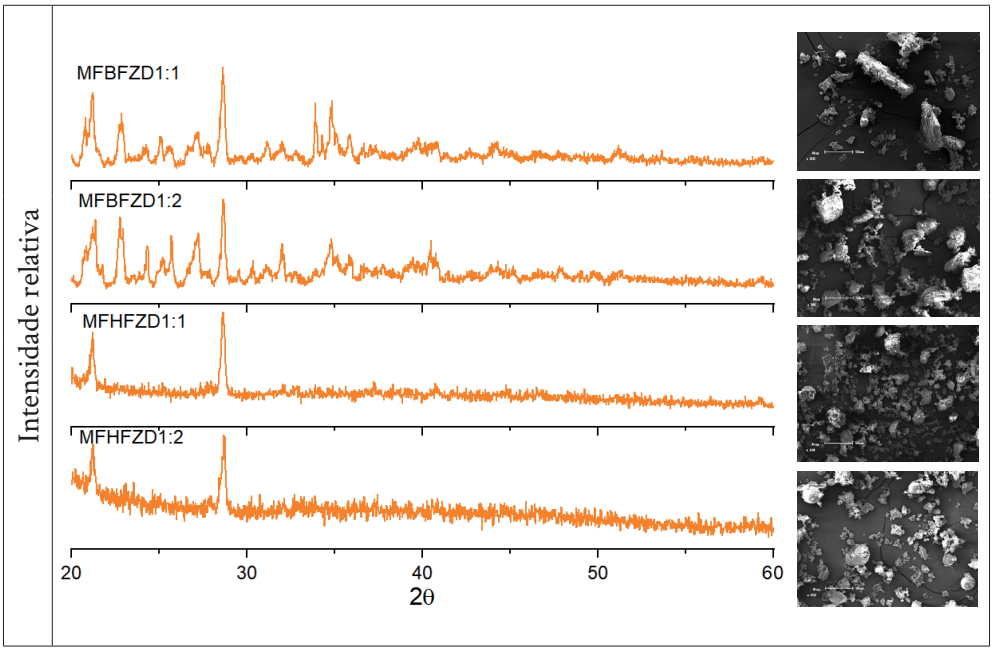


Fonte: Elaboração própria.

Os difratogramas e as fotomicrografias das amostras FZD:β-CD podem ser vistas na Figura 11. Para os produtos da malaxagem, nas razões molares 1:1 e 1:2, os

difratogramas são semelhantes aos das misturas físicas, sem alterações nos padrões difratométricos da FZD e da β-CD. Tais observações são confirmadas pelas fotomicrografias, nas quais podem ser vistos cristais do fármaco. Para os produtos da liofilização, pequenas alterações nos padrões de reflexão podem ser vistas para o produto LBFZD1:2. Nas fotomicrografias de ambos os produtos (LBFZD1:1 e LBFZD1:2), os cristais da FZD não podem ser identificados e há uma mistura de partículas de morfologia alterada, além da formação de agregados, ao contrário do observado na imagem dos materiais de partida. Şoica e colaboradores (2012) avaliaram a morfologia de complexos entre a betulina e derivados da γ-CD obtidos por malaxagem e observaram nas microfotografias a presença de partículas de tamanho reduzido, tendendo à agregação, sugerindo a presença de interação durante a complexação. Os perfis difratométricos dos complexos FZD:β-CD e FZD:HP-β-CD correspondem à sobreposição dos difratogramas do fármaco e das CDs, para ambas as razões molares estudadas (Figura 11).

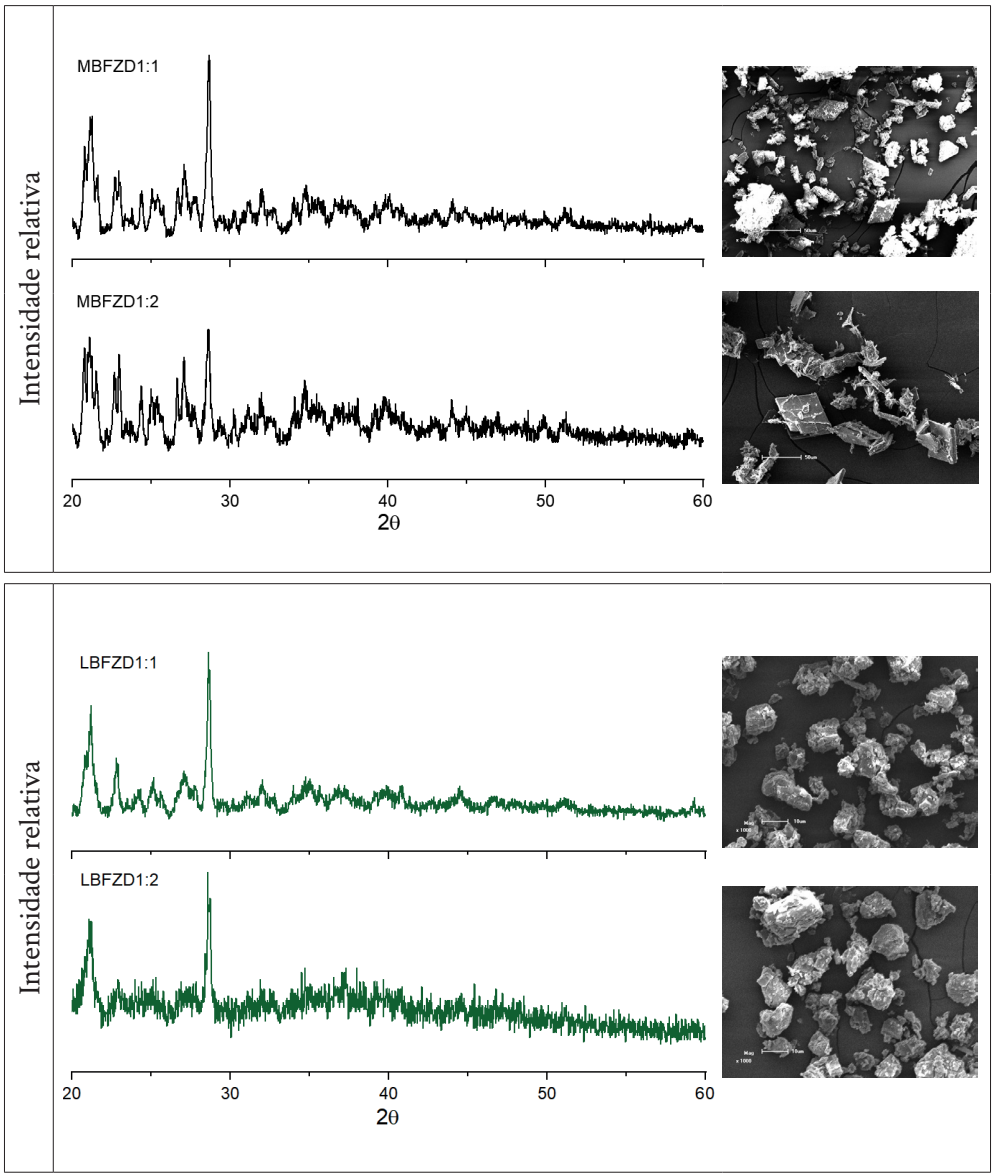
Figura 11: Difratogramas de raios X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) das misturas físicas



Fonte: Elaboração própria.

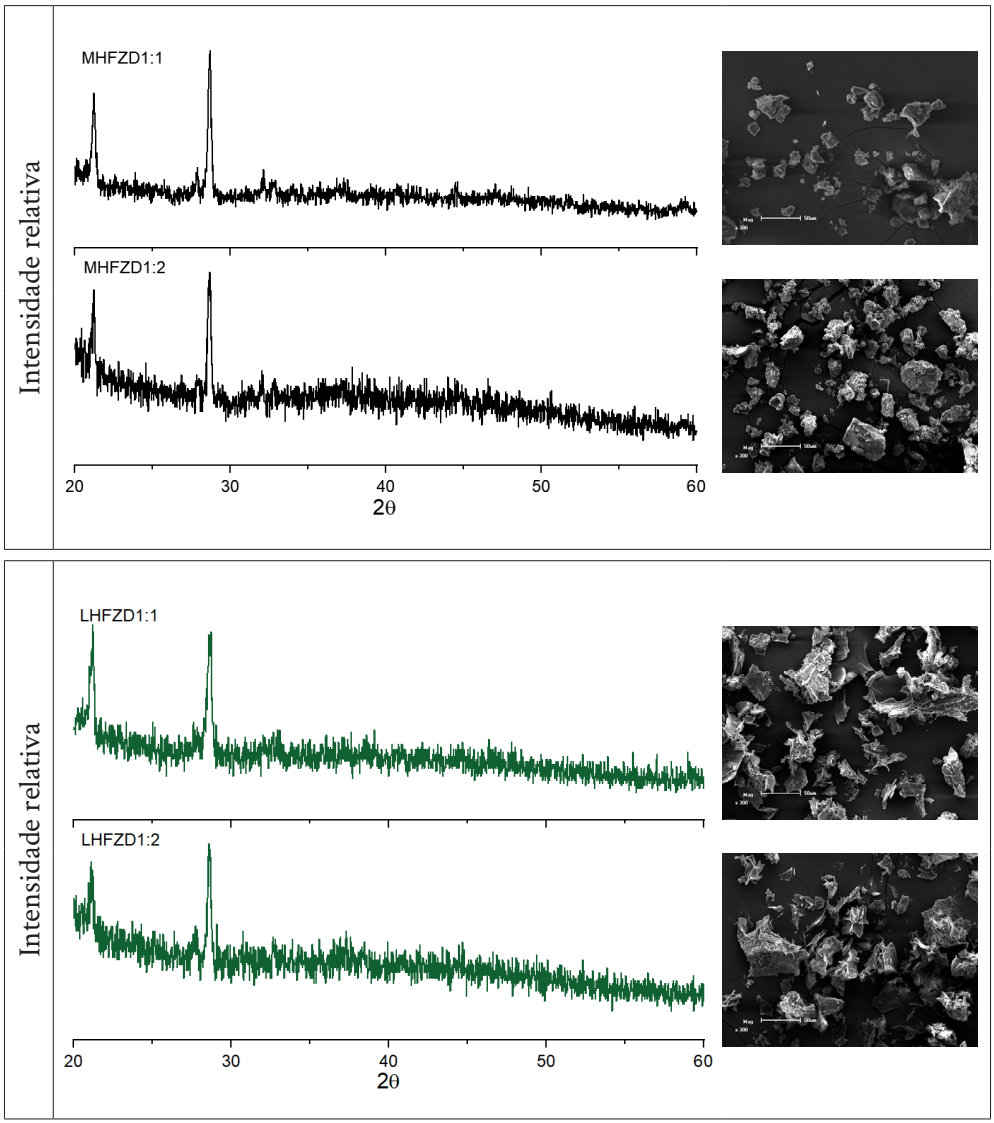
Para as amostras preparadas a partir da HP-β-CD (Figura 13), alterações mais significativas nos padrões de reflexão podem ser observadas nos difratogramas dos produtos MHFZD1:2 (preparado por malaxagem), LHFZD1:1 e LHFZD1:2 (preparados por liofilização), evidenciando a redução da cristalinidade e a existência de interações entre as moléculas hóspede e hospedeira. Como pode ser visto nas fotomicrografias destes produtos, ocorreu a formação de partículas com morfologia e tamanho diferentes do observado para a FZD e para a CD, além da ausência das partículas do fármaco e da HP-β-CD. Tais achados comprovam a existência de amorfização das partículas. Para a amostra MHFZD1:1 podem ser vistos cristais da FZD. A maior redução da cristalinidade foi observada para a amostra LBFZD1:2 e para as amostras preparadas a partir da HP-β-CD, sugerindo que esta CD foi mais eficaz ao se associar ao fármaco e alterar a forma cristalina da FZD, denotando eficiência na formação de CIs.

Figura 12: Difratogramas de raios X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) dos complexos obtidos a partir da β-ciclodextrina



Fonte: Elaboração própria.

Figura 13: Difratogramas de raios X e fotomicrografias (magnificação de 300 X; 20 keV) dos complexos obtidos a partir da hidroxipropil-β-ciclodextrina



Fonte: Elaboração própria.

Resultados semelhantes foram encontrados por Loh, Tan e Peh (2016), ao prepararem CIs da norfloxacina baseados na β-CD e HP-β-CD pelas técnicas de mistura física, malaxagem e evaporação do solvente. Tang e colaboradores (2015) prepararam CIs clorzoxazona:β-CD e clorzoxazona:HP-β-CD pelo método de liofilização, com o objetivo de aumentar a solubilidade e reduzir a toxicidade do fármaco. Os autores avaliaram os CIs pela técnica de DRX e observaram a ocorrência de amorfização dos complexos preparados a partir da HP-β-CD como hospedeira.

EDUFES
EDITORA

Espectroscopia Raman

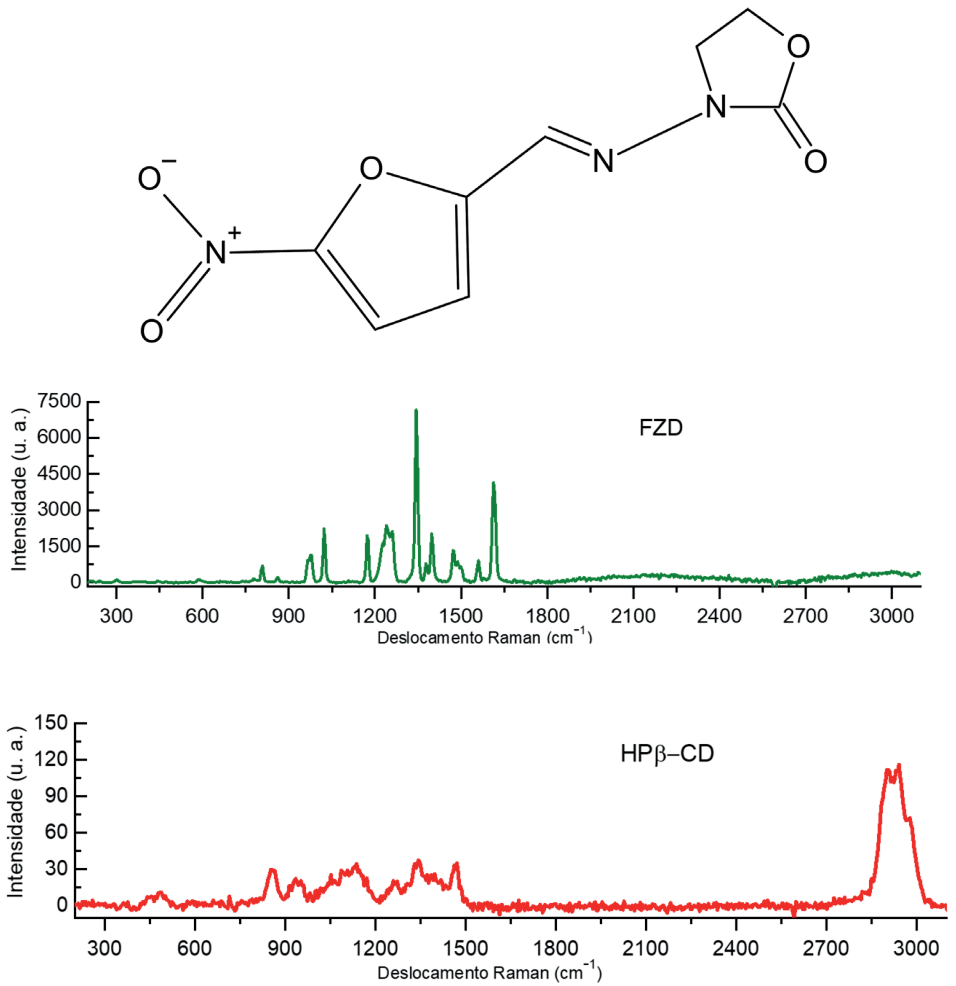
Espectros Raman das amostras foram registados em condições ambientais com emprego de microscópio confocal e laser de cristal verde bombeado por diodo polarizado linear, com feixe de excitação em comprimento de onda nominal de 532 nm (2,33 eV). As análises foram feitas com microscópio acoplado, com feixe 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 dispositivo de carga acoplada (CCD) espectroscópico retroiluminado a ar (Andor) por trás de um filtro de borda e espectrógrafo de grade (Acton). O tempo de integração foi de 60 s a 1 mW. Os espectros foram obtidos por meio do programa Origin® 9.1.

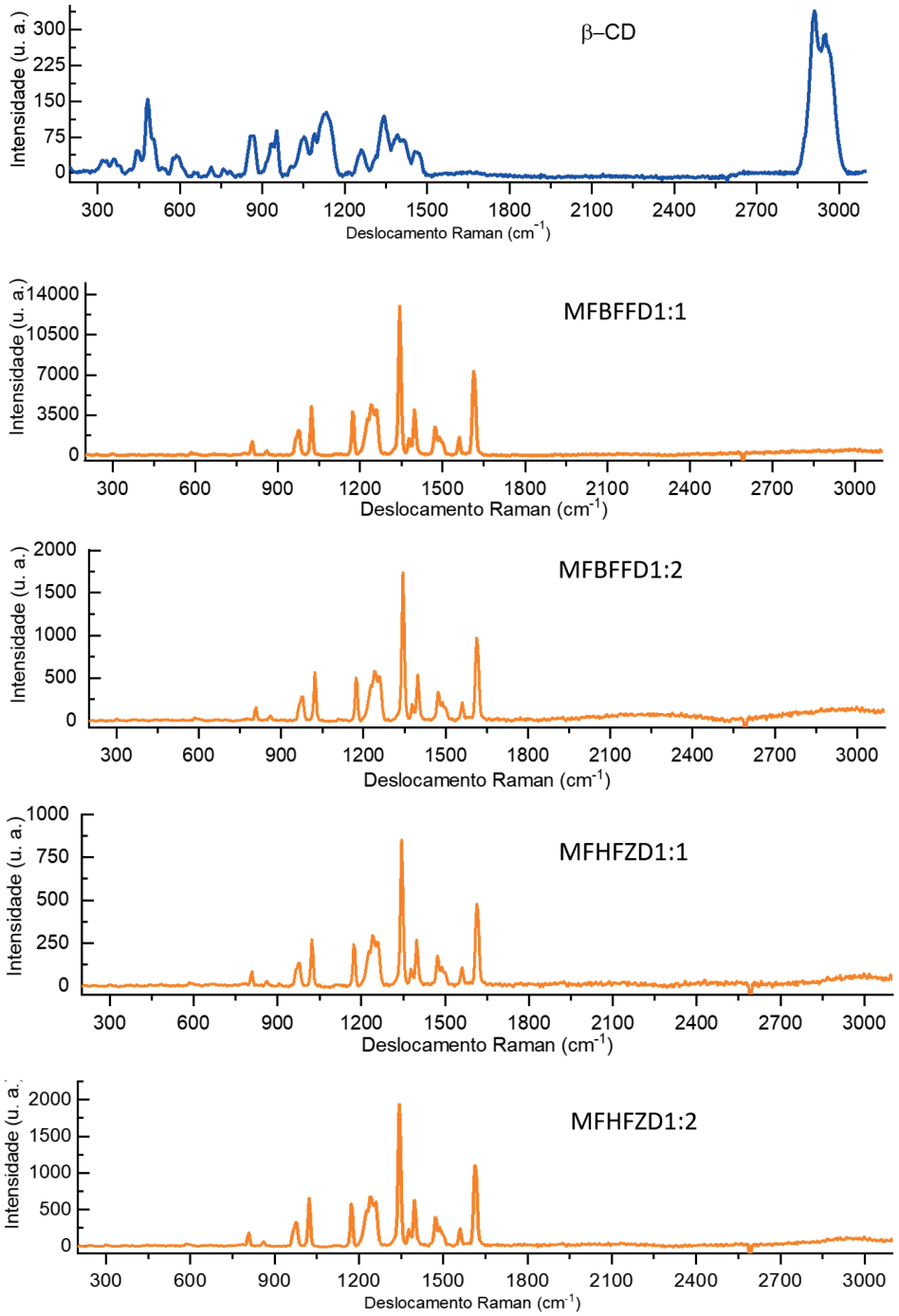
A espectroscopia Raman se mostra útil para pesquisar a amorfização de fármacos após a associação dos CIs, em decorrência das interações das moléculas ou de parte das moléculas com o interior da cavidade das CDs (PAUDEL; RAIJADA; RANTANEN, 2015).

É possível notar no espectro da furazolidona a presença de picos proeminentes, de grande intensidade, localizados entre 1000 e 1650 cm^{-1}, entre os quais aqueles atribuídos a vibrações do estiramento simétrico nas ligações C-O-C do anel furânico (~1020 cm^{-1}) e a vibrações do estiramento da ligação C=N (~1600 cm^{-1}) (ZHANG *et al.*, 2012). O padrão de intensidade dos picos em espectros Raman, atribuídos à estrutura da β-CD e da HP-β-CD, é menor quando comparado aos da FZD. Assim, devido à elevada intensidade dos sinais da FZD nos espectros Raman das misturas físicas, somente estes são observados, uma vez que se sobressaem (Figura 14).

Resultados semelhantes podem ser observados nos espectros dos complexos FZD:β-CD, nas razões molares 1:1 e 1:2, preparados por malaxagem e liofilização, não havendo evidências de atenuação da cristalinidade (Figura 15). Por outro lado, para o produto obtido a partir da HP-β-CD, preparado por malaxagem, na razão molar 1:2 (MHFZD1:2), pode ser notada redução drástica na intensidade dos sinais da FZD. Modificações significativas também podem ser vistas nos espectros dos produtos FZD:HP--β-CD obtidos por liofilização, para ambas as razões molares estudadas (Figura 16).

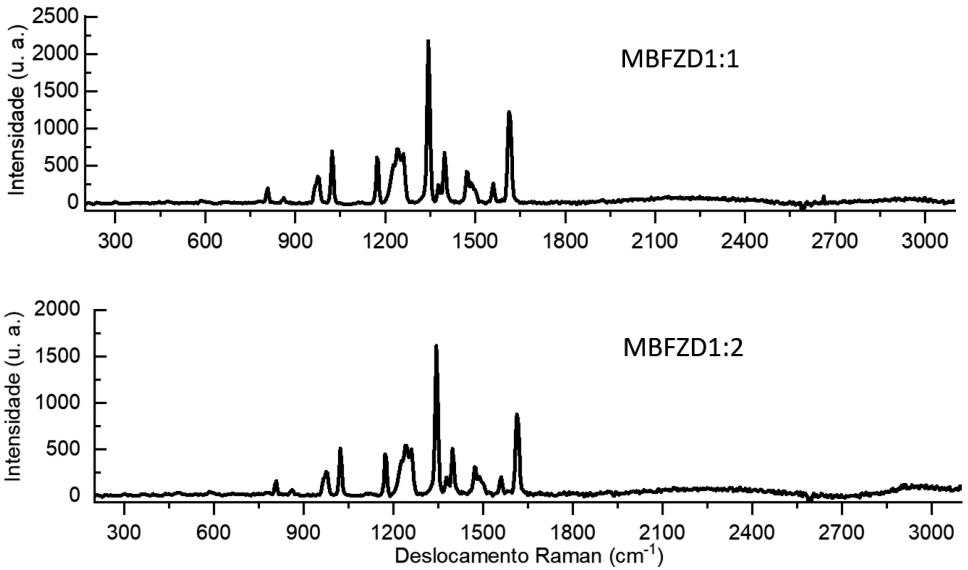
Figura 14: Espectro Raman dos materiais de partida e das misturas físicas





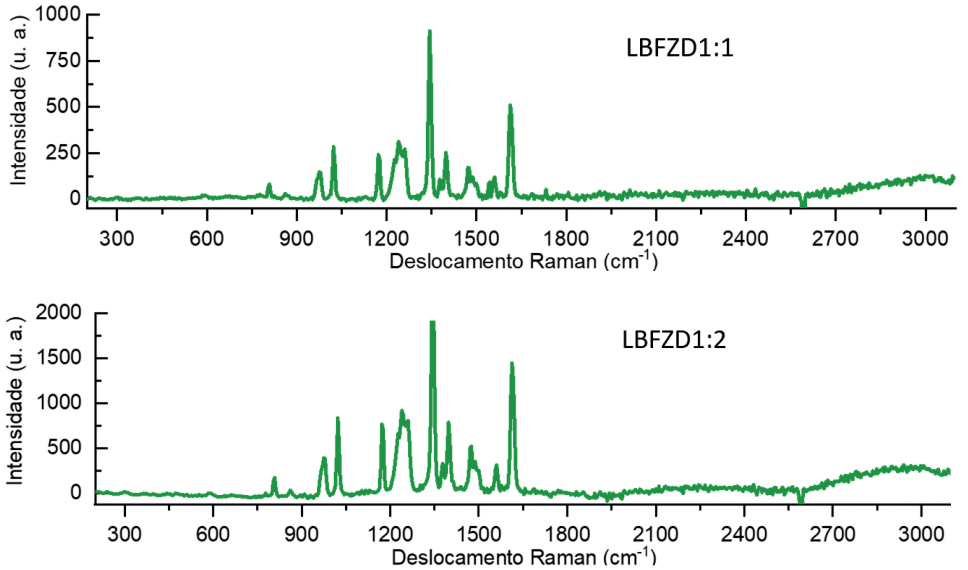
Fonte: Elaboração própria.

Figura 15a: Espectro Raman dos produtos FZD:β-CD preparados por malaxagem



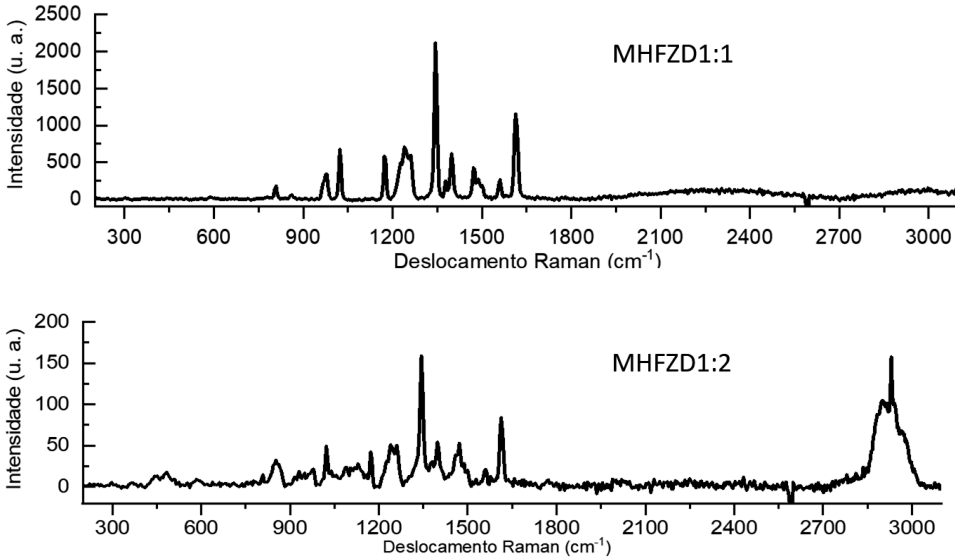
Fonte: Elaboração própria.

Figura 15b: Espectro Raman dos produtos FZD:β-CD preparados por liofilização



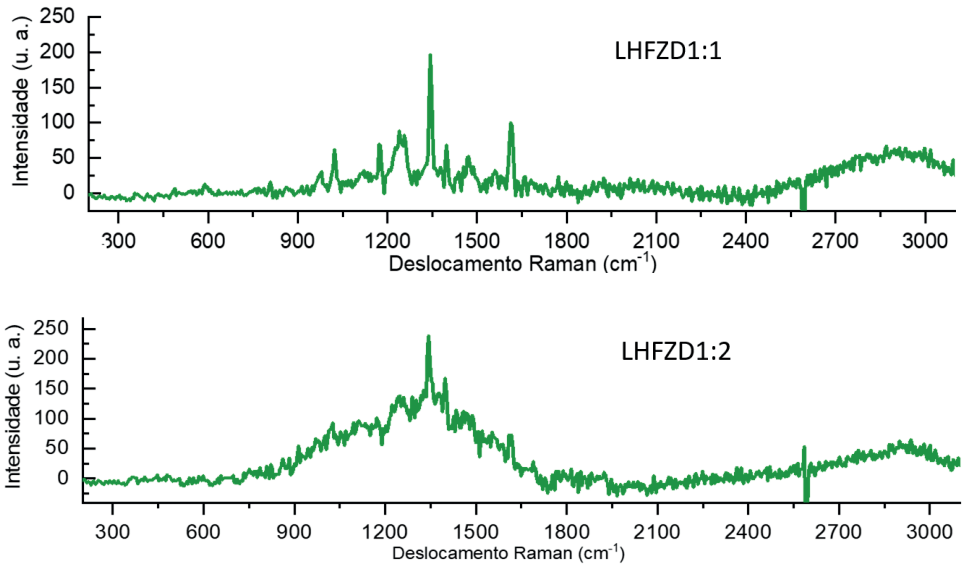
Fonte: Elaboração própria.

Figura 16a: Espectro Raman dos produtos FZD:HP-β-CD preparados por malaxagem



Fonte: Elaboração própria.

Figura 16b: Espectro Raman dos produtos FZD:HP-β-CD preparados por liofilização



Fonte: Elaboração própria.

Nas imagens dos espectros fica evidente a ocorrência da atenuação da intensidade dos picos da FZD além da sobreposição de picos não resolvidos, o que se dá em função da restrição das vibrações das ligações presentes na FZD, originada da associação do fármaco com a cavidade das moléculas hospedeiras (TIJUNELYTE *et al.*, 2017). Além de indicarem a existência de amorfização, estes achados são indicativos também do sucesso da complexação para as amostras MHFZD1:2, LHFZD1:1 e LHFZD1:2. Para estas, ocorreu redução da intensidade dos sinais da FZD, provavelmente devido à redução da polarização molecular de elétrons em relação aos grupos que se associaram à CD, em função das interações existentes, levando à diminuição no espalhamento da luz incidente. Não há evidência de amorfização ou de formação de complexos preparados a partir da β-CD pela avaliação dos resultados de espectroscopia Raman, ao contrário do observado pelas análises térmicas e por difração de raios X/microscopia eletrônica de varredura (DRX/MEV).

RMN de ^{13}C no estado sólido

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

Foram realizados experimentos de CP/MAS com frequência de rotação em torno do ângulo mágico de 10 kHz, aplicação de pulso de 3,6 μs nos núcleos de 1 H, intervalo de 5 s entre pulsos, tempo de contato de 10 ms, tempo de aquisição de 81,92 ms, aquisição de 1500 transientes, janela espectral de 50 kHz e 8192 pontos. No processamento do decaimento livre de indução (FID), foi realizada uma apodização exponencial com line broadening (lb) igual a 30. Os espectros foram obtidos por meio do programa Origin® 9.1.

As técnicas de RMN em solução permitem não só a confirmação de CIs mas, também, a elucidação da estrutura dos complexos, identificando a parte da molécula hóspede que está incluída na cavidade da CD hospedeira. Como os demais métodos de caracterização, a partir da comparação dos sinais dos espectros dos CIs com os

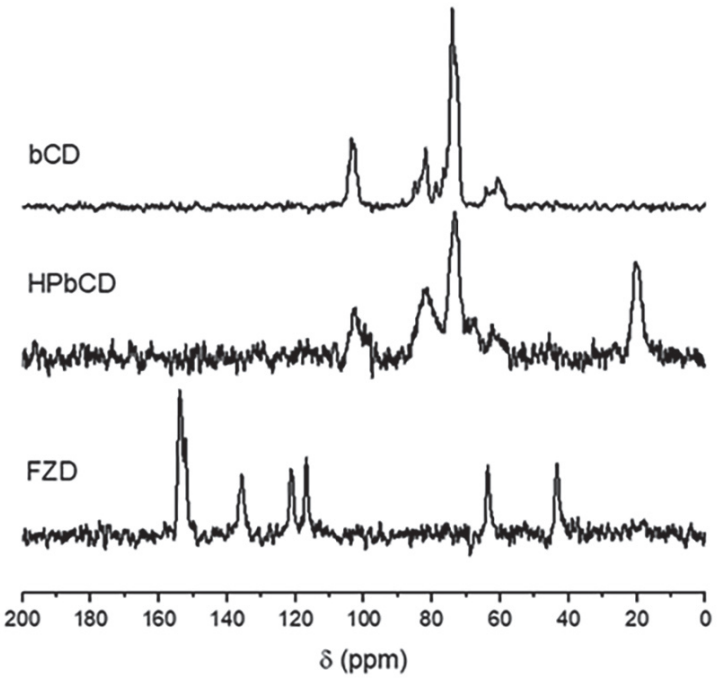
dos materiais de partida e das misturas físicas, é possível confirmar a formação dos CIs (BORODI *et al.*, 2008). Contudo, a principal desvantagem associada ao método é o alto custo do equipamento e dos solventes empregados.

A RMN em estado sólido de ^{13}C é uma das variáveis mais versáteis da técnica para o estudo da formação dos CIs, especialmente quando combinada com as técnicas de CP/MAS, que fornecem espectros de ^{13}C de alta resolução a partir de amostras sólidas, permitindo o estudo da morfologia (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). Para detecção da forma cristalina encontrada, os parâmetros espectrais avaliados são a falta de multiplicidade de sinais, presença de desvios químicos nos espectros e alterações na largura da linha padrão. Arrúa e colaboradores (2015) prepararam CIs entre o praziquantel e diferentes CDs pelo método de coevaporação do solvente e empregaram técnicas de RMN de ^{13}C e ^{15}N no estado sólido para elucidar as estruturas dos compostos formados e confirmar o sucesso de complexos. Os autores concluíram que a razão molar 1:2 pareceu ser a mais efetiva na formação dos complexos.

No espectro registrado para a FZD pura, nota-se a presença de sinais bem definidos, com associações de picos e picos isolados estreitos, nas faixas de 150-160 ppm, 130-140 ppm, 92-117 ppm, 60-67 ppm e 40-45 ppm. Tal espectro é consistente com a cristalinidade da amostra de FZD já revelada pelos métodos de espectroscopia Raman e DRX. Já no espectro registrado para a β-CD, é possível observar a presença dos seis carbonos das unidades de D-glicopiranose, com sinais estreitos identificados na faixa de 55-110 ppm: picos na faixa 100-110 ppm são devidos ao sítio atômico C1; na faixa 80-86 ppm, associados a C4; em 71-78 ppm, associados aos átomos de carbono C2, C3 e C5; e, finalmente, sinais na faixa de 56-64 ppm, associados ao C6. A existência de vários picos para cada sítio atômico, deve-se à ocorrência de diferentes orientações moleculares ou conformações na estrutura cristalina da CD.

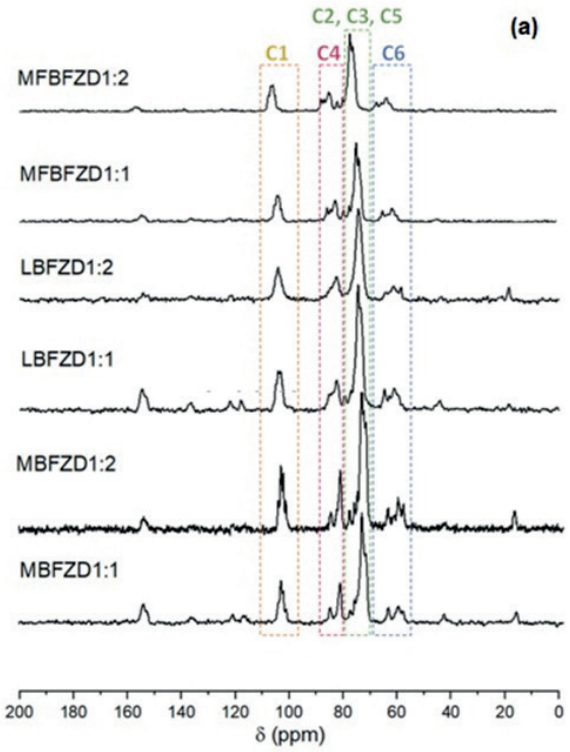
Ao contrário do observado no espectro RMN de ^{13}C no estado sólido da β-CD, e como corroborado pelos resultados das análises de espectroscopia Raman e DRX e pela literatura, o espectro RMN de ^{13}C no estado sólido da HP-β-CD é característico de um composto amorfo, sem a existência de múltiplas ressonâncias para um mesmo sítio atômico. Para a HP-β-CD, foram identificados picos nas faixas de 59-107 ppm para o C1; 93-107 ppm para C2, C3 e C5; 69-76 ppm para C4; 78-84 ppm e 59-64 ppm para C6. Os espectros RMN de ^{13}C no estado sólido da β-CD, da HP-β--CD e da FZD são dados na Figura 17.

Figura 17: Espectros de RMN ^{13}C no estado sólido obtidos para a β-CD, HP-β-CD e da FZD



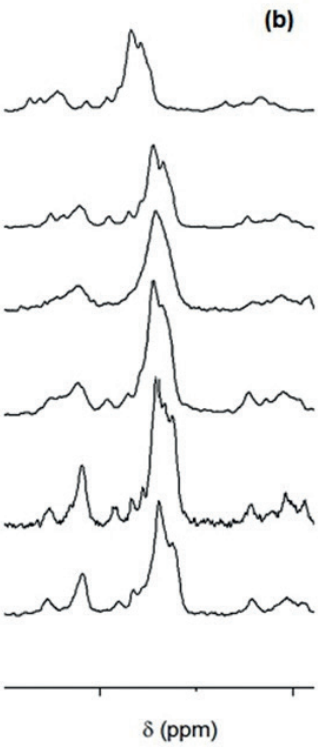
Fonte: Elaboração própria.

Figura 18a: Espectros de RMN ^{13}C no estado sólido obtidos para os produtos baseados na β-CD: faixa de 0 a 200 ppm



Fonte: Elaboração própria.

Figura 18b: Espectros de RMN ^{13}C no estado sólido obtidos para os produtos baseados na β-CD: ampliação da região entre 60 e 90 ppm

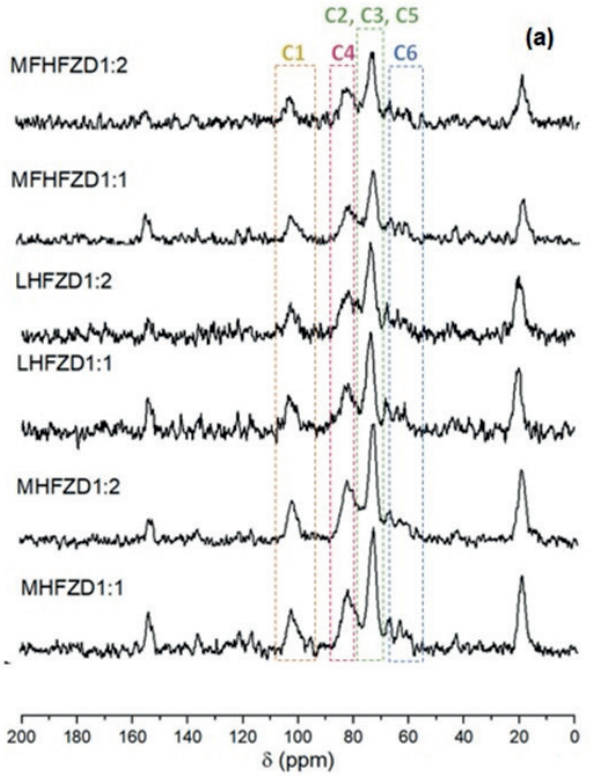


Fonte: Elaboração própria.

Nos espectros das misturas físicas e dos complexos FZD:β-CD (Figura 18a), alterações significativas nos sinais da β-CD somente são observadas no espectro da amostra LBFZD1:2, no qual há convergência de sinais, entre 82-88 ppm, atribuídos ao C4 da CD. A convergência de sinais, ou seja, a ausência de picos associados no espectro, sugere que as unidades de D-glicopiranose adotaram conformação mais simétrica em decorrência da complexação, culminando com sua amorfização. Ainda, no espectro LBFZD1:2 nota-se a ausência de sinais da FZD em 156-148 ppm, 124-114 ppm e 46-40 ppm, sugerindo que parte da estrutura do fármaco está associada à CD. Nos demais produtos, a ausência de sinais da FZD em determinadas faixas sugere a existência de interações entre as moléculas hóspede e hospedeira. Contudo,

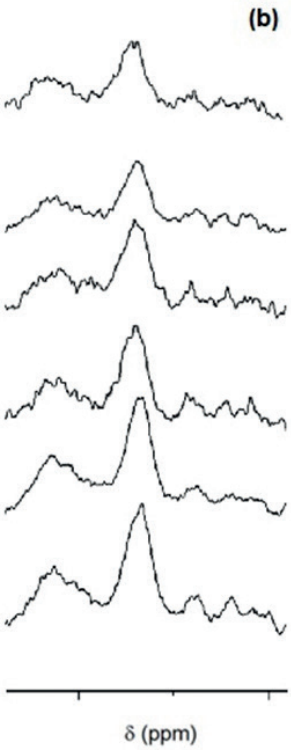
a observação de sinais múltiplos nestes espectros, atribuídos aos átomos de C2, C3, C5, C4 e C6 das unidades glicosídicas da β-CD, indica a coexistência de diferentes arranjos estruturais no composto, o que sugere a mistura dos produtos da complexação com os materiais de partida.

Figura 19a: Espectros de RMN ^{13}C no estado sólido obtidos para os produtos baseados na HP-β-CD: faixa de 0 a 200 ppm



Fonte: Elaboração própria.

Figura 19b: Espectros de RMN ^{13}C no estado sólido obtidos para os produtos baseados na HP-β-CD: ampliação da região entre 60 e 80 ppm



Fonte: Elaboração própria.

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

EDUFES
EDITORA

Avaliação biológica *in vitro*

A atividade leishmanicida e as avaliações de citotoxicidade foram realizadas por métodos *in vitro*, em todas as amostras submetidas aos ensaios de caracterização. Os estudos foram realizados levando em consideração os requisitos básicos para avaliação do potencial de atividade *in vitro* apresentado por amostras com potencial atividade contra *Leishmania*, como recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Segundo recomendações, os ensaios preliminares para a busca de novos agentes leishmanicidas devem atender a alguns pré-requisitos, tais como: os métodos empregados devem oferecer medidas de atividade quantificáveis e reprodutíveis; os compostos estudados devem oferecer respostas em pequenas quantidades (inferior a 1,0 mg); os compostos devem apresentar atividade sobre diferentes cepas; e o método deve ser rápido e de baixo custo.

Foram realizados testes por meio de semiautomação, com emprego de corante resazurina e avaliação do índice de inibição do crescimento de formas promastigotas de cepas de *L. amazonensis*. Simultaneamente, a avaliação citotóxica *in vitro* dos compostos foi pesquisada com uso da linhagem celular THP-1. Como pode ser observado na Tabela 3, a atividade citotóxica dos compostos estudados sobre linhagens de macrófagos THP-1 foi superior a 450,00 μg/mL para todas as amostras estudadas, o que sugere ausência de citotoxicidade.

Tabela 3: Valores obtidos para inibição do crescimento (IC_{50}) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, medida da citotoxicidade sobre macrófagos THP-1 (CC_{50}) após 72 horas e índice de seletividade (IS) calculado para os compostos

Compostos	**IC_{50} (µg/mL) ± EPM**	**CC_{50} (µg/mL)**	**IS**
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
Misturas físicas			
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
FZD:β-CD			
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
FZD:HP-β-CD			
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.

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras estudadas apresentaram atividade leishmanicida sobre *L. amazonensis* quando comparadas aos controles negativos (CDs puras). Para a β-CD e a HP-β-CD, foram necessárias concentrações maiores que 100,0 μg/mL para redução da população de formas promastigotas de *L. amazonensis* em 50 %. Por outro lado, o crescimento dessa população foi inibido pelo tratamento com a FZD pura, por doses com IC_{50} de 6,3 μg/mL, sugerindo que as formas promastigotas 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, entre 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. 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 ao fármaco, com valores de IC_{50} variando de 0,47 μg/mL a 0,73 μg/mL.

Para as misturas físicas MFBFZD1:2 (complexo FZD:β-CD, 1:2) e MFHFZD1:1 (complexo FZD:HP-β-CD, 1:1), os valores de IC_{50} observados foram próximos ao 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 as misturas MHFZD1:2 e LHFZD1:2, os valores de IC_{50} foram três e duas 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 ação leishmanicida. Para todas as demais amostras, os valores de IC_{50} foram superiores a 14,86 μg/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, indicando que a solubilidade e a permeabilidade do fármaco podem ter sido alteradas negativamente.

Silva e colaboradores (2012) estudaram a atividade leishmanicida de frações de extratos ricos em alcaloides de espécies de plantas medicinais amazônicas através da contagem diferencial de promastigotas usando o método do corante eritrosina B. Os autores classificaram a atividade leishmanicida das frações com base nos valores de IC_{50} da seguinte forma: frações com valores de $IC_{50} < 10$ μg/mL foram classificadas como altamente ativas; frações com valores de IC_{50} entre 10 μg/mL e 50 μg/mL foram consideradas ativas; as frações moderadamente ativas apresentaram valores de

IC_{50} entre 50 μg/mL e 100 μg/mL; e frações não ativas apresentaram valores de IC_{50} > 100 μg/mL. Com base nos mesmos critérios e nas mesmas condições testadas, podemos classificar a FZD e os produtos da complexação MHFZD1:2 e LHFZD1:2 como sendo altamente ativos contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

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

Existem relatos na literatura acerca da complexação de fármacos como estratégia para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas. Balaraman e colaboradores (2015) prepararam CIs entre a 2-n-propilquinolina e a HP-β-CD e demonstraram, através de métodos *in vitro*, que o complexo apresentou atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. donovani*, com valores de IC_{50} de 6,22 a 0,82 μM, sem apresentar toxicidade em macrófagos. Bhattacharya e Dash (2016) avaliaram a atividade leishmanicida da piperolactama A (PL) sobre cepas de *L. donovani* dos tipos selvagem e resistentes a fármacos. Extratos de PL isolados e purificados apresentaram um alto nível de atividade leishmanicida, com valores de IC_{50} entre 36,0 μM e 103,0 μM. Complexos PL:β-CD apresentaram aumento de dez vezes e de quatro a dez vezes nos valores de IC_{50} sobre cepas resistentes a fármacos e de tipo selvagem, respectivamente. A redução na IC_{50} observada para estes agentes pode ser atribuída à diminuição da solubilidade aparente da FZD em decorrência da existência de alterações na cristalinidade dos compostos, após a complexação com as moléculas hospedeiras.

Métodos de preparo e caracterização dos complexos de inclusão

Inúmeras técnicas de complexação estão descritas na literatura, e a preparação dos CIs 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). Artifícios como a ionização do fármaco, a modificação do pH do meio, o uso de aquecimento no processo, o emprego de cossolventes e o uso de polímeros solúveis 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.

A complexação por malaxagem é o procedimento preferido para fármacos de solubilidade muito baixa em água e envolve a formação de uma pasta, em gral 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 é adicionada com a intenção de manter a consistência da pasta. Ao final do processo, a pasta é secada a 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. Nesse método, a CD e o fármaco devem ser dispersos na água, ou em mistura hidroalcóolica, 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 que ele tem para 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 CIs com CDs, sendo os métodos complementares entre si. As principais técnicas usualmente empregadas e os parâmetros avaliados em cada uma são sumarizados no Quadro 3.

Quadro 3: Técnicas utilizadas na caracterização de complexos de inclusão

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 (Kc) 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 de as 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 na região dos 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, em que o difratograma do complexo formado é claramente diferente dos componentes individuais.
Espectroscopia Raman	Qualitativo e quantitativo. Detecta mudanças significativas nas vibrações simétricas, nos grupos não polares e nas bandas homoatômicas. Realiza caracterização espectroscópica da cristalinidade.

Fonte: Lyra e colaboradores (2012).

Entre os inúmeros métodos disponíveis para avaliação do sucesso da complexação, 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 do tempo, enquanto é submetido a um programa controlado de temperatura. As técnicas termoanalíticas mais empregadas para estudar a complexação com CDs são a DSC, a TG, a DTG e a análise térmica diferencial (DTA) (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; SINGH *et al.*, 2010; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012a).

A DSC é considerada uma técnica confiável para investigar o processo de complexação, pois possui sensibilidade para detectar alterações nos perfis termoanalíticos das amostras. Com os eventos endotérmicos de desidratação e a molécula hóspede em forma cristalina, o pico correspondente ao ponto de fusão torna-se bem definido. Quando ocorre a formação de complexo, espera-se que o pico de fusão desapareça, mude ou se amplie, devido à perda da cristalinidade causada pelo encapsulamento. Pela análise de DSC, pode-se obter temperatura máxima (T_{peak}), variação de entalpia (ΔH) e temperatura de transição (T_{on} e T_{end}) – 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 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 ao final da reação com maior precisão, o que é 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 ΔT em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos aparecem 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 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; MOHAMAD; 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. Na interpretação da técnica, notam-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 RMN é uma das mais úteis técnicas para estudar interações de CDs com hospedeiros. Diferentes técnicas de RMN são usadas para caracterização de CIs e envolvem desde técnicas simples, como espectros de RMN de hidrogênio (HRMN), até experimentos mais sofisticados, como a espectroscopia ordenada por difusão (DOSY), a espectroscopia rotativa por efeito *overhauser* (ROESY) e a RMN de ^{13}C no estado sólido através de CP/MAS (PESSINE; CALDERINE; ALEXANDRINO, 2012).

Informações estruturais sobre CIs podem ser obtidas usando RMN de ^{13}C no estado sólido (VOGT; STROHMEIER, 2012). A técnica fornece informações acerca da organização molecular a 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 com RMN de ^{13}C no estado sólido são difíceis de observar devido à forte sobreposição. Para contornar tais problemas, uma célula contendo a amostra é rotacionada em torno do ângulo mágico para fazer desaparecer a anisotropia de deslocamento químico. Assim, quando combinada a técnica com a 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 CIs utilizando CDs 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 (VAJNA *et al.*, 2011).

Tendo como base todas as técnicas utilizadas no preparo e caracterização de CIs, é possível observar que houve indícios da existência de interações nos produtos LBFZD1:2, MHFZD1:1, MHFZD1:2, LHFZD1:1 e LHFZD1:2. Pela avaliação das imagens de MEV, pode-se notar a presença de cristais de FZD nas amostras MBFZD1:1 e MBFZD1:2 e, para todas as demais, é possível observar perda da estrutura cristalina da FZD e da β-CD, alterações da morfologia das partículas da HP-β-CD e formação de aglomerados, o que é indicativo da existência de interações entre as moléculas hóspede e hospedeira. A partir dos dados de DRX, pode-se inferir que a maior redução da cristalinidade foi observada para as amostras LBFZD1:2, MHFZD1:2, LHFZD1:1 e LHFZD1:2, em concordância com os achados pelas técnicas de DSC e TG/DTG. Por outro lado, a análise dos espectros Raman indica a existência de amorfização para as amostras MHFZD1:2, LHFZD1:1 e LHFZD1:2, sendo as alterações mais significativas observadas neste último produto. Por fim, dados do RMN de ^{13}C

no estado sólido sugerem a ocorrência de interações efetivas nas amostras dos produtos LBFZD1:2 e LHFZD1:2.

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

Há formação de tipos de associações entre fármacos e CDs denominadas "não complexas". Nelas são estabelecidas, entre as moléculas hóspede e hospedeira, interações fora da cavidade das CDs, especialmente mediante ligações de hidrogênio. Ainda, em soluções aquosas, as CDs podem formar agregados ou agregados micelares, contribuindo para os processos de solubilidade e permeabilidade de compostos fracamente solúveis em água. Entre as agregações tipo micela entre diferentes tipos de CDs (γ-CD, HP-β-CD e HP-γ-CD) e fármacos estão a hidrocortisona e a dexametasona, com aumento da solubilidade do fármaco (LOFTSSON; MÁSSON; SIGURDSSON, 2002; JANSOOK; KURKOV; LOFTSSON, 2010). As associações não complexas ou agregadas podem apresentar, além de solubilidade alterada, quando comparada à do fármaco puro, atividade biológica significante (GARCIA; MARTINS; PONS, 2012). Martins e colaboradores (2009) obtiveram produtos de associação entre a β-CD e o AntM e, após pesquisa da existência de interações entre as moléculas, os autores confirmaram a formação de agregados entre a β-CD e o fármaco na razão molar 1:1. Ao contrário dos fármacos comumente usados em associação com β-CD, o meglumina é altamente solúvel em água (solubilidade > 300 mg/mL). Garcia, Martins e Pons (2012) investigaram as interações moleculares entre a β-CD ou a HP-β-CD e a riboflavina. Eles avaliaram o potencial anticancerígeno dos compostos obtidos por liofilização nas razões molares 1:1. Segundo os autores, não foram detectadas interações entre a riboflavina e a cavidade das CDs, mas as associações não complexas apresentaram maior solubilidade e atividade anticancerígena sobre linhagens de células PC3.

A análise conjunta dos resultados de DSC, TG/DTG, DRX, MEV, espectroscopia Raman e RMN de ^{13}C no estado sólido sugere o sucesso na formação de complexos a partir do uso da β-CD (LBCD1:2) e da HP-β-CD (LHFZD1:2), ambas preparadas por liofilização e na razão molar 1:2. Para as demais amostras, as técnicas de análise evidenciaram a ocorrência de modificações nos espectros, o que sugere a existência de interações entre a FZD e as CDs com formação de agregados do tipo não

complexos. Pelas técnicas de análises térmicas, foram notados deslocamentos nas temperaturas de detecção da desidratação, da fusão do fármaco e da termodecomposição das moléculas de partida. Alterações na cristalinidade foram confirmadas pelos demais métodos. Os resultados encontrados nos ensaios da atividade leishmanicida comprovam que tanto o fármaco livre quanto os produtos de complexação propostos apresentaram atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo os produtos MHFZD1:2 e LHFZD1:2 os candidatos mais promissores para o uso pretendido, uma vez que apresentaram os menores valores de IC_{50}. Para todos os demais, apesar da existência de atividade leishmanicida e da não toxicidade, os valores de IC_{50} foram maiores que o observado para o fármaco puro. Assim, pode-se concluir que a formação de complexos e agregados entre a FZD e CDs de interesse farmacêutico é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de medicamentos anti-leishmania para uso veterinário.

REFERÊNCIAS

ABARCA, R. L. *et al.* 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.

ALAM, M. I.; 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, Mar. 2016.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

AMIDON, G. L.; SHAH, V. 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.

ARRÚA, E. C. *et al.* Elucidating the guest-host interactions and complex formation of praziquantel and cyclodextrin derivatives by ^{13}C and ^{15}N solid-state NMR spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 812-821, 30 Dec. 2015.

BALARAMAN, K. *et al.* In vitro and in vivo antileishmanial properties of a 2-n-propylquinoline hydroxypropyl β-cyclodextrin formulation and pharmacokinetics via intravenous route. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 76, p. 127-133, Dec. 2015.

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, n. 5, p. 947-951, Sept. 1983.

BHATTACHARYA, S. K.; DASH, A. P. Treatment of visceral leishmaniasis: options and choice. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 142-143, Feb. 2016.

BHISE, S. D. Effect of hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complexation on solubility of fenofibrate. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 596-604, June 2011.

BORODI, G. et al. Spectroscopic investigations and crystal structure from synchrotron powder data of the inclusion complex of β-cyclodextrin with atenolol. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 70, n. 5, p. 1041-1048, 2008.

BOSQUESI, P. L. *et al.* 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**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 30 July 2007.

CARVALHO, S. G. *et al.* Advances and challenges in nanocarriers and nanomedicines for veterinary application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 580, p. 1-15, 30 Apr. 2020a.

CARVALHO, S. G. *et al.* Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based β-cyclodextrin complexes in *Leishmania amazonensis*. **Research in Veterinary Science**, v. 119, p. 143-153, Aug. 2018.

CARVALHO, S. G. *et al.* Physicochemical characterization and in vitro biological evaluation of solid compounds from furazolidone-based cyclodextrins for use as leishmanicidal agents. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1788-1809, Dec. 2020b.

CARVALHO, S. G. *et al.* Polymeric-based drug delivery systems for veterinary use: state of the art. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 604, p. 1-17, 2021.

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. *et al.* Dehydrocrotonin and its beta-cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. **European Journal Pharmacology**, v. 510, n. 1-2, p. 17-24, Mar. 2005.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, May 2001.

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

DANG, Z. *et al.* Applications of powder X-ray diffraction to inclusion complexes of cyclodextrins. **Current Organic Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 848-861, 2011.

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

DE ANGELIS, I. *et al*. Metabolism of furazolidone: alternative pathways and modes of toxicity in different cell lines. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1157-1169, 1999.

DEMICHELI, C. *et al.* Oral delivery of meglumine antimoniate-β-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 100-103, Jan. 2004.

DHARMASTHALA, S. *et al.* Fast dissolving oral film of piroxicam: solubility enhancement by forming an inclusion complex with β-cyclodextrin, formulation and evaluation. **Journal of Young Pharmacists**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2019.

DOMAŃSKA, U.; PELCZARSKA, A.; POBUDKOWSKA, A. Effect of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin on solubility of sparingly soluble drug derivatives of anthranilic acid. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2383-2394, 6 Apr. 2011.

EISIG, J. N. *et al.* A furazolidone-based quadruple therapy for *Helicobacter pylori* retreatment in patients with peptic ulcer disease. **Clinics**, v. 60, n. 6, p. 485-488, 2005.

FRÉZARD, F. *et al.* Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin nanoassemblies. **International Journal Pharmaceutic**, v. 347, n. 1-2, p. 102-108, Jan. 2008.

GARCIA, J.; MARTINS, L. G.; PONS, M. NMR spectroscopy in solution. **ChemInform**, v. 43, n. 28, July 2012.

GASHEVA, L. M. *et al.* IR spectroscopic investigations of amoxicillin trihydrate, included in the technological models sirup granules in ethylcellulose. **Journal of Molecular Structure**, v. 115, n. 1-2, p. 323-326, Mar. 1984.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 14 Dec. 2001.

GONTIJO, B. B. *et al.* 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, jan. 2003.

GOULD, S.; SCOTT, R. C. 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-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**: an update. Romainville: Hoechst Roussel Vet, 1999. p. 32-39.

GUEDES, F. L. *et al.* Ciclodextrinas: 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. New York: John Wiley & Sons, 1994.

HAO, Y. *et al.* Inclusion complex of artemether with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin for the treatment of malaria: preparation, characterization and evaluation. **MOJ Bioequivalence & Bioavailability**, v. 3, n. 6, p. 145-151, 2017.

HEUSSER JÚNIOR, A. *et al.* 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, nov.-dez. 2010.

HUNDER, G.; SCHMID, A.; MAYRING, L. Investigation 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, Feb. 2016.

JANSOOK, P.; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as solubilizers: formation of complex aggregates. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 99, n. 2, p. 719-729, Feb. 2010.

JIANG, X. *et al.* A novel application of furazolidone: anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia. **Plos One**, v. 8, n. 8, 9 Aug. 2013.

KHADKA, P. *et al.* Pharmaceutical particle technologies: an approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 6, p. 304-316, Dec. 2014.

KON, K.; RAI, M. **Antibiotic resistance**: mechanisms and new antimicrobial approaches. London: Elsevier, 2015.

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

LEISHMANIOSES: informe epidemiológico das Américas. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, n. 6, fev. 2018. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5. Acesso em: 14 jul. 2022.

LOFTSSON, T. *et al.* Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 335-351, Mar. 2005.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; SIGURDSSON, H. H. Cyclodextrins and drug permeability through semi-permeable cellophane membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 232, n. 1-2, p. 35-43, Jan. 2002.

LOH, G. O. K.; TAN, Y. T. F.; PEH, K. K. Enhancement of norfloxacin solubility via inclusion complexation with β-cyclodextrin and its derivative hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 536-546, Aug. 2016.

LOPES, M. S. *et al.* The activity of a metronidazole analogue and its β-cyclodextrin complex against *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p. 1055-1057, Dec. 2011.

LYRA, M. A. M. *et al.* Study of benznidazole-cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, p. 397-404, 2012.

MARIAN, E. *et al.* Interactions analysis between furazolidone and excipients used in pharmaceutical forms. **Revista de Chimie**, Bucharest, v. 64, n. 11, p. 1275-1278, 2013.

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

MARTINS, M. H.; CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T. Host-guest interactions between dapsone and b-cyclodextrin (Part II): thermal analysis, spectroscopic characterization, and solubility studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 74, n. 1-4, p. 109-116, 2012.

MARTINS, P. S. *et al.* Physicochemical characterization of orally-active meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin nanoassemblies: non-inclusion interactions and sustained drug release properties. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 1a, p. 223-225, 2009.

MENDES, C. *et al.* Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and β-cyclodextrin: physicochemical characteristics, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 71-78, Feb. 2016.

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

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

PASSOS, S. R. *et al.* Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 463-465, Nov. 2014.

PAUDEL, A.; RAIJADA, D.; RANTANEN, J. Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 3-20, July 2015.

PAWAR, A. R.; CHOUDHARI, P. 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. 13, p. 9-14, 2012.

PESSINE, F. B. T.; CALDERINI, A.; ALEXANDRINO, G. L. Review: cyclodextrin inclusion complexes probed by NMR techniques. *In*: KIM, D.-H. (ed.). **Magnetic resonance spectroscopy**. IntechOpen, 2012. p. 237-264. *E-book*.

PINTO, I. S. *et al.* 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. *et al.* 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. β-cyclodextrin production by cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphile *Microbacterium terrae* KNR 9 using different starch substrates. **Biotechnology Research International**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

RAOOV, M.; MOHAMAD, S.; ABAS, M. R. Synthesis and characterization of β-cyclodextrin functionalized ionic liquid polymer as a macroporous material for the removal of phenols and As(V). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 5, 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, mar. 2010.

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

SASANI, F. *et al.* Canine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 1, p. 57-60, jan.-mar. 2016.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, article ID 195727, 2012.

SCARPIGNATO, C. Piroxicam-β-ciclodextrin: a GI safer piroxicam. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2415-2437, 2013.

SILVA, F. M. A. *et al.* Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from Amazonian unonopsis species. **Brazilian Journal of Pharmacognsosy**, v. 22, p. 1368-1371, 2012.

SINGH, R. *et al.* Characterization of cyclodextrin inclusion complexes: a review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SOARES SOBRINHO, J. L. *et al.* 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.

ŞOICA, C. *et al.* Betulin complex in γ-cyclodextrin derivatives: properties and antineoplasic activities in *in vitro* and *in vivo* tumor models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14992-15011, 2012.

SWEETMAN, S. **Martindale**: the complete drug reference. 36. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. 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, Jan.-Feb. 2012a.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. 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, Jan.-Feb. 2012b.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. 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, Jan.-Feb. 2012c.

TANG, P. *et al.* Inclusion complexes of chlorzoxazone with β- and hydroxypropyl-β--cyclodextrin: characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 297-305, Oct. 2015.

TEMPONE, A. G. *et al.* Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 2, p. 159-163, Aug. 2010.

TIJUNELYTE, I. *et al.* Investigation of aromatic hydrocarbon inclusion into cyclodextrins by Raman spectroscopy and thermal analysis. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 24, n. 35, p. 27077-27089, Dec. 2017.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. The United States Pharmacopeia 34: the National Formulary 29. v. 3. Rockville, MD.: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VAJNA, B. *et al.* Characterization of drug-cyclodextrin formulations using Raman mapping and multivariate curve resolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 1, p. 38-44, Aug. 2011.

VEIGA, F. J. B.; PECORELLI, C. C. M. F.; RIBEIRO, S. S. L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006.

VLACHOU, M; PAPAIÖANNOU, 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, Jan. 2003.

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

WAGH, M. P.; PATEL, J. S. Biopharmaceutical classification system: scientific basis for biowaiver extensions. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 12-19, 2010.

WEN, J. *et al.* Preparation and physicochemical properties of the complex of naringenin with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4401-4407, June 2010.

YANG, Y. *et al.* Inclusion complex of tamibarotene with hydroxypropyl-β-cyclodextrin: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 187-192, Mar. 2017.

ZHANG, L. *et al.* Effects of hydroxylpropyl-β-cyclodextrin on *in vitro* insulin stability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 5, p. 2031-2040, 2009.

ZHANG, L. *et al.* The hydroxypropyl-β-cyclodextrin complexation of toltrazuril for enhancing bioavailability. **Drug Designer, Development and Therapy**, v. 12, p. 583-589, 2018.

ZHANG, Y. *et al.* Analyses of enrofloxacin, furazolidone and malachite green in fish products with surface enhanced Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 845-850, 2012.

EDUFES
EDITORA

SOBRE A AUTORA

Suzana Gonçalves Carvalho é capixaba e possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Espírito Santo (2017). É mestra em Ciências Veterinárias pela mesma instituição (2019), sob orientação da professora Janaína Cecília Oliveira Villanova. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, com período sanduíche no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S) da Universidade do Porto (Portugal), sob orientação do professor Bruno Sarmento. Conquistou premiações e menções honrosas ao longo da sua trajetória acadêmica, tendo conquistado premiações em congressos regionais, nacionais e internacionais, além de destaque no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e de ter a primeira colocação em Ciências Agrárias no Prêmio Ufes de Teses e Dissertações (Edição 2021/2022). Possui experiência em farmacotécnica, tecnologia farmacêutica, nanotecnologia, complexação com ciclodextrinas, câncer colorretal, desenvolvimento de sistemas baseados em polímeros e desenvolvimento de produtos de uso veterinário.

EDUFES
EDITORA

ÍNDICE REMISSIVO

Símbolos

β-CD, *ver* β-ciclodextrina

β-ciclodextrina 15, 25, 26, 27-30, 39, 40, 41-44, 47-51, 52, 54, 58, 65, 70, 72-76, 80-81, 88, 89

A

antimoniato de meglumina 28, 29, 40, 89

AntM, *ver* antimoniato de meglumina

B

biodisponibilidade 14, 15, 21, 23, 24, 25, 29, 33, 36, 37, 40, 87

C

calorimetria exploratória diferencial 15, 36, 37, 41-47, 85

CI, *ver* complexo de inclusão

complexo de inclusão 15, 23-26, 29, 35, 83, 85, 88

cristalinidade 36, 37, 57, 60, 66, 72, 82, 85, 86, 87, 88, 90

D

difração de raios X 15, 37, 57-63, 85, 86, 87, 88, 89

DRX, *ver* difração de raios X

DSC, *ver* calorimetria exploratória diferencial

E

espectroscopia Raman 15, 37, 65-70, 85, 86, 88, 89

F

furazolidona 14, 15, 18, 19-22, 24, 35-37, 39-40, 41, 42, 47, 49, 50, 58, 59, 60, 65, 66, 70, 72-73, 75, 77, 80, 81, 82, 88, 89, 90

FZD, *ver* furazolidona

H

hidroxipropil-β-ciclodextrina 15, 31-33, 36, 37, 39, 41, 44-46, 47, 48-51, 53-55, 58-60, 62-63, 65, 66, 72, 73, 76, 77, 80, 81, 82, 88

HP-β-CD, *ver* hidroxipropil-β-ciclodextrina

L

LCC, *ver* leishmaniose cutânea canina

Leishmania amazonensis 13, 15, 18, 21, 22, 28, 35, 37, 40, 79, 80, 81, 82, 90

leishmaniose cutânea canina 13, 17-18, 22, 35

liofilização 15, 22, 28, 29, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 52, 55, 59, 60, 63, 66, 68, 69, 83, 84, 88, 89

M

malaxagem 15, 22, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 52, 55, 58, 59, 60, 63, 66, 68, 69, 83

MEV, *ver* microscopia eletrônica de varredura

microscopia eletrônica de varredura 57-63, 70, 85

R

ressonância magnética nuclear 15, 37, 71-77, 85, 86, 87, 88, 89

RMN, *ver* ressonância magnética nuclear

S

solubilidade 14, 15, 19, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 57, 63, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 89

A leishmaniose cutânea canina é considerada uma antropozoonose. Ainda não existe farmacoterapia disponível, no Brasil, para o tratamento dela. Porém, a atividade leishmanicida da furazolidona vem sendo apontada. O fármaco não é utilizado no tratamento em humanos, porém relatos científicos apontam a furazolidona como um quimioterápico com boa atividade leishmanicida. Contudo, problemas de toxicidade animal também foram indicados, sugerindo uma baixa solubilidade e altas doses requeridas nos tratamentos. Entre inúmeras alternativas farmacotécnicas disponíveis, 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 pode aumentar a estabilidade e favorecer o mascaramento do sabor dos fármacos. Este livro é destinado principalmente a estudantes e profissionais de Farmácia, Medicina Veterinária, Zootecnia e Parasitologia.

Suzana Gonçalves Carvalho é capixaba, graduada em Farmácia e mestra em Ciências Veterinárias pela Ufes. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Unesp com período sanduíche pelo i3S, da Universidade do Porto (Portugal). Conquistou premiações e menções honrosas em congressos regionais, nacionais e internacionais. Primeira colocada no Prêmio Ufes de Teses e Dissertações (Edição 2021/2022) na área de Ciências Agrárias. Tem experiência em desenvolvimento de produtos de uso veterinário.

Este livro foi vencedor do **1º Prêmio Ufes de Teses e Dissertações,** como o melhor trabalho da Grande Área **Ciências Agrárias** defendido no quadriênio 2017-2020.

A busca por alternativas farmacêuticas para tratar a leishmaniose cutânea canina 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, o uso para o tratamento da leishmaniose cutânea em cães pode ser considerado, já que ainda não existe farmacoterapia disponível no Brasil para isso.

Este livro contém o relato de um estudo desenvolvido durante o projeto de mestrado. Vencedora do Prêmio Ufes de Teses e Dissertações (Edição 2021/2022) na área de Ciências Agrárias, a dissertação de mestrado também ganhou premiação no 22nd International Symposium on Microencapsulation, e a autora foi convidada a publicar na revista *Drug Delivery and Translational Research.*

EDUFES