

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DOUTORADO EM QUÍMICA

Elgte Elmin Borges de Paula

**Encapsulação de moléculas com atividade antileishmania e antimalárica em ciclodextrinas: preparo, caracterização físico-química e avaliação biológica.**

Juiz de Fora

2013

Elgte Elmin Borges de Paula

**Encapsulação de moléculas com atividade antileishmania e antimalárica em ciclodextrinas: preparo, caracterização físico-química e avaliação biológica.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia Cavalieri Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra Millán

Juiz de Fora

2013

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob a orientação da  
Profa. Dra. Flávia Cavalieri Machado e co-orientação do  
Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra Millán.

*Aos **meus pais**, por tudo que fizeram para que eu me dedicasse exclusivamente aos estudos e pelo amor com que me educaram.*

*Aos **meus irmãos e afilhados**, pelo suporte, amizade e carinho.*

*Ao **Cláudio**, por seu amor, dedicação e companheirismo.*

*À minha amada **Lauren Carolina**, por ser a luz da minha vida.*

*Dedico-lhes este trabalho,  
simplesmente, porque a vida me parece irrealizável sem vocês!*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Profa. Dra. Flávia Cavalieri Machado, pela minha formação científica e por ter marcado a minha vida de uma forma muito especial. Obrigada pela oportunidade de crescimento, pela confiança e pela valiosa amizade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Encapsulação Molecular e Biomateriais (LEMB), onde desenvolvi estágio de um ano.

Ao Prof. Dr. Frederico Barros de Sousa, pelos imprescindíveis ensinamentos e por ser um exemplo de dedicação e competência. Obrigada por ter sido em alguns momentos um amigo e em outros um orientador e ainda, por todo suporte dado, juntamente com a Profa. Dra. Juliana, durante o período que morei em BH.

Aos companheiros de laboratório, meus queridos amigos: Victor, Felipe, Lívia, Naiara e Anderson, por tornarem os meus dias mais agradáveis. Aos amigos do LEMB, em especial, ao Joel e à Michele, pessoas admiráveis com as quais tive a honra de conviver. À Dra. Ivana Lula, pelos diversos esclarecimentos.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, em especial: Profa. Dra. Ana Paula Soares Fontes, Prof. Dr. Richard Michael Grazul, Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Prof. Dr. Marcone Augusto de Oliveira Leal, Prof. Dr. Luís Antônio Sodré e Prof. Dr. Hélio Ferreira dos Santos. Aos funcionários do departamento de química, por todo o suporte dado.

Aos colaboradores pelas valiosas contribuições: professores doutores Frédéric Frézard, Maria Norma Melo, Antoniana Ursine Krettli e Marcone Augusto de Oliveira Leal e colegas Júlio César Cardoso da Silva, Flaviana Ribeiro Fernandes, Joel J. Passos, Michele Fabiane de Oliveira e Dr. Fernando Simas.

Aos queridos amigos: Bruna, Tatiane, Juninho e Leonardo, por serem excelentes companheiros e pela valiosa amizade. Ao Leo, agradeço também por ter sido a minha família, durante o período que moramos juntos em BH.

A todos os integrantes do NEQC: Willian, Dudu, Arthur, Lucas e Gilson, pelos quais tenho um carinho muito especial. Aos amigos: Douglas, Betinho, Fernando, Bianca, Arturene e Luciano.

Aos meus amados pais, Emídio e Maria Eugênia, por terem dado a devida importância aos estudos e por terem me ensinado os valores norteadores de uma vida

humilde e honesta. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação. Certamente, o mérito desta conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos: Magda, Dagma, Ilgma, Olgda, Uideu, Ilgze e Elgba, por serem meus companheiros de toda a vida e meus melhores amigos. E por demonstrarem que é possível sonhar e crescer através dos estudos e do trabalho. Amo vocês! Aos meus amados afilhadinhos: Heitor, Júlia, Matheus e Lorenzo, por me ganharem com um olhar e um sorriso sincero e por me proporcionarem momentos muito especiais.

Ao Édson Stecca, por ter usado talento e bondade para mudar a minha vida.

Ao Cláudio, meu amor e amigo, pelo companheirismo, dedicação e incentivo. Obrigada por compreender a importância dessa conquista e pelo suporte dado, que foi indispensável para que eu a alcançasse.

Aos queridos: Sebastião e Maria Emília, por todo carinho e apoio.

À minha filhinha Lauren Carolina, por ter caminhado comigo para a realização deste sonho. Por ser minha força, meu refúgio e por me trazer tantas alegrias e aprendizados. Eu a amo louca e inexplicavelmente!

A Deus, por iluminar o meu caminho e por colocar pessoas tão especiais na minha vida.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela minha formação.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*

*Fernando Pessoa (Ricardo Reis)*

*“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.  
Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”*

*Clarice Lispector*

## RESUMO

Este trabalho compreende um estudo de sistemas supramoleculares estabilizados por interações não covalentes, formados entre substâncias utilizadas no tratamento de doenças negligenciadas, como as leishmanioses e a malária, com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD). Investigou-se a associação do antileishmanico Isotionato de Pentamidina (PNT), do antimalárico Artesunato (AS) e do potencial antimalárico 1-(7-cloroquin-4-il)-tiossemicarbazida (CQT) com  $\beta$ CD.

Os compostos envolvendo  $\beta$ CD e PNT foram obtidos pelo método de liofilização, ao passo que os compostos envolvendo AS e CQT foram obtidos por secagem por nebulização. Os compostos foram caracterizados por técnicas no estado sólido por espectroscopia vibracional da região do infravermelho (IV), análise térmica (TG/DTA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em solução, utilizou-se espectrometria de massas com ionização por eletrospray (IES-EM), ressonância magnética nuclear uni e bidimensional ( $^1\text{H}$  e ROESY) e titulação calorimétrica isotérmica (ITC) (apenas o sistema envolvendo PNT). Além disso, os compostos tiveram sua atividade biológica investigada.

Combinando técnicas termodinâmicas e estruturais como ITC, IES-EM e RMN, o processo de inclusão e os parâmetros termodinâmicos foram identificados. Os dados experimentais obtidos por ITC e IES-EM sugerem a formação simultânea de diferentes complexos supramoleculares em solução. Além disso, os dados de RMN sugerem uma inclusão profunda de PNT na cavidade de  $\beta$ CD. Os testes biológicos realizados *in vivo*, evidenciaram a atividade por via oral do composto de inclusão estudado ( $\beta$ CD:PNT)1:1, em relação ao fármaco livre, o qual é inativo. Tais resultados foram promissores no que se refere à investigação de uma alternativa terapêutica para o tratamento da Leishmaniose.

Para o sistema formado entre AS e  $\beta$ CD, as caracterizações indicaram a formação de um sistema supramolecular envolvendo as duas espécies. Experimentos do tipo DOSY, indicaram o mesmo coeficiente de difusão para fármaco e macromolécula, evidenciando assim que os precursores evoluem juntos.

Para CQT, verificou-se que o composto de inclusão ( $\beta$ CD:CQT) não foi formado. Deste modo, preparou-se o composto ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, o qual foi devidamente caracterizado. Os resultados obtidos por ROESY indicaram interações entre os hidrogênios benzênicos, H5, H6 e H8, com os hidrogênios H-3 e H-5 situados na

cavidade da molécula hospedeira, evidenciando a formação do composto de inclusão com  $\alpha$ CD.

Os ensaios biológicos para os antimaláricos AS e CQT foram realizados *in vivo*. A toxicidade aguda do composto de inclusão ( $\beta$ CD:AS)1:1 não apresentou toxicidade aos camundongos após 5 dias de administração. Adicionalmente, realizou-se ensaios para avaliar a atividade citotóxica de AS, ( $\beta$ CD:AS)1:1 e CQT. Os resultados indicaram que as moléculas não apresentaram toxicidade *in vitro* para células renais e hepáticas. A atividade *in vivo* de CQT foi testada contra *P. berghei*, constatando-se o potencial antimalárico foi ativo no quinto e sétimo dias, reduzindo aproximadamente 66 % da parasitemia.

**Palavras-chave:** ciclodextrinas, Pentamidina, Artesunato, compostos de inclusão, doenças negligenciadas, leishmaniose e malária.

## ABSTRACT

This work includes a study of supramolecular systems stabilized by non-covalent interactions, formed between the substances used in the treatment of neglected diseases such as leishmaniasis and malaria, with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD). We investigated the association of antileishmanial pentamidine isethionate (PNT), the antimalarial artesunate (AS) and potential antimalarial 1,7-chloroquinolinyl-thiosemicarbazide (CQT) with  $\beta$ CD.

The compounds involving PNT were obtained by lyophilization, while compounds involving AS and CQT were obtained by spray drying. The compounds were characterized by standard solid state methods such as vibrational spectroscopy in the infrared region (IR), thermal analysis (TG/DTA) and scanning electron microscopy (SEM). In solution, we used mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-MS), nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and ROESY) and isothermal titration calorimetry (ITC) (only the system involving PNT). Furthermore, the compounds have biological activity investigated.

Combining thermodynamic and structural techniques such as ITC, ESI-MS and NMR, the inclusion process and the thermodynamic parameters were identified. The experimental data obtained by ESI-MS and ITC suggest the simultaneous formation of different supramolecular complexes in solution. Also, NMR data suggest a deep inclusion of PNT in  $\beta$ CD cavity. The biological tests performed *in vivo* showed the oral activity of inclusion compound studied ( $\beta$ CD:PNT)1:1, compared to free drug which is inactive. These results are promising with regard to the investigation of alternative therapeutic alternatives for leishmaniasis treatment.

For the system formed between AS e  $\beta$ CD the characterizations indicated the formation of a supramolecular system involving two species. DOSY experiments indicated the same diffusion coefficient for the drug and the macromolecule, showing the formation of inclusion compound ( $\beta$ CD:AS)1:1.

It was verified that ( $\beta$ CD:CQT) inclusion compound was not formed. Thus the compound ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 was prepared, which was properly characterized. The ROESY results indicated interactions between the aromatic hydrogens, H5, H6 and H8 with H-3 and H-5 located in the cavity of host molecule, showing the formation of inclusion compound with  $\alpha$ CD.

The biological tests for antimalarials AS and CQT were performed *in vivo*. Acute toxicity of the inclusion compound ( $\beta$ CD:AS)1:1 showed no toxicity to mice after 5 days of administration. Additionally, tests were conducted to evaluate the cytotoxic activity of AS, ( $\beta$ CD:AS)1:1 and CQT. The results indicated that the molecules showed no toxicity *in vitro* in renal and hepatic cells. The *in vivo* activity of CQT was tested against *P. Berghei*, noting the potential antimalarial was active in the fifth and seventh days, reducing approximately 66% parasitemia.

**Key words:** cyclodextrins, pentamidine, artesunate, inclusion compounds, neglected diseases, leishmaniose and malaria.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i> .....	25
<b>Figura 2:</b> Estrutura química dos fármacos antimoniais: a) Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) e b) Estibogluconato de Sódio (Pentostan®).....	26
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da Anfotericina B.....	26
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da estrutura do fármaco Isotionato de Pentamidina (PNT).....	27
<b>Figura 5:</b> Ciclo de vida do parasita da malária humana.....	29
<b>Figura 6:</b> Representação da artemisinina e seus derivados: a) Artemisinina, b) Diidroartemisinina (DHA), c) artemeter (AM) e d) arteéter (AE).....	32
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da estrutura do fármaco Artesunato (AS).....	33
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da estrutura dos fármacos: a) Cloroquina, b) Amodiaquina, c) Quinina, d) Mefloquina e e) Primaquina.....	35
<b>Figura 9:</b> Estrutura genérica das tiossemicarbazidas, onde R1, R2, R3 e R4 = H, alquila, arila.....	36
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática da estrutura do potencial antimalárico cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida (CQT).....	36
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática da $\beta$ CD: a) monômero e b) visualização lateral do cone.....	40
<b>Figura 12:</b> Síntese do cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida (CQT).....	45
<b>Figura 13:</b> Curvas termogravimétricas: a) $\beta$ CD, b) PNT, c) ( $\beta$ CD:PNT)1:1 e d) MM( $\beta$ CD:PNT).....	58
<b>Figura 14:</b> Curva termogravimétrica para os compostos: ( $\beta$ CD:PNT)1:1, ( $\beta$ CD:PNT)2:1, ( $\beta$ CD:PNT)3:1 e ( $\beta$ CD:PNT)4:1.....	59
<b>Figura 15:</b> Espectros vibracionais na região do infravermelho obtido para os precursores $\beta$ CD e PNT e para os compostos ( $\beta$ CDPNT)1:1 e MM( $\beta$ CDPNT).....	61
<b>Figura 16:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura para: a) PNT, b) ( $\beta$ CDPNT)1:1, c) ( $\beta$ CDPNT)2:1, d) ( $\beta$ CDPNT)3:1 e e) ( $\beta$ CDPNT)4:1.....	63
<b>Figura 17:</b> Dados finais de ITC para processo exotérmico.....	68
<b>Figura 18:</b> Dados de ITC após a correção dos dados e integração.....	69

<b>Figura 19:</b> Curvas de ITC simuladas para uma interação química para diferentes valores de $c$ .....	72
<b>Figura 20:</b> Titulação calorimétrica isotérmica para o composto ( $\beta$ CD:PNT)1:1: curva de titulação da PNT: ■ em H <sub>2</sub> O, ■ em $\beta$ CD e b) (-) curva de titulação final, ■ curva após a subtração dos dados de diluição da PNT em H <sub>2</sub> O e (---) regressão não linear.....	73
<b>Figura 21:</b> Dados de ITC para o composto ( $\beta$ CD:PNT)1:1: (-) curva de titulação final, ■ curva após a subtração dos dados de diluição da PNT em H <sub>2</sub> O e (---) regressão não linear.....	74
<b>Figura 22:</b> Espectro (IES (+)-EM) obtido para PNT.....	75
<b>Figura 23:</b> Espectro (IES (+)-EM) obtido para ( $\beta$ CD:PNT)1:1.....	76
<b>Figura 24:</b> Espectro (IES (+)-EM) obtido para ( $\beta$ CD:PNT)2:1.....	76
<b>Figura 25:</b> Espectro (IES (+)-EM) obtido para ( $\beta$ CD:PNT)3:1.....	77
<b>Figura 26:</b> Espectro (IES (+)-EM) obtido para ( $\beta$ CD:PNT)4:1.....	78
<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para a $\beta$ CD em D <sub>2</sub> O.....	80
<b>Figura 28:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para a $\beta$ CD em DMSO-d <sup>6</sup> .....	80
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN para o fármaco PNT obtido em D <sub>2</sub> O.....	81
<b>Figura 30:</b> Mapa de contorno COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H para PNT, obtido a 400 MHz, em D <sub>2</sub> O....	82
<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C para a PNT a 400 MHz, em D <sub>2</sub> O.....	83
<b>Figura 32:</b> Mapa de contorno HSQC <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C-DEPT 135 para a PNT a 400 MHz, em D <sub>2</sub> O.....	84
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto ( $\beta$ CD:PNT)1:1 obtido em D <sub>2</sub> O.....	85
<b>Figura 34:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, na faixa de 4,3 a 3,0 ppm, em 400MHz em D <sub>2</sub> O para os compostos de inclusão preparados nas seguintes proporções a) ( $\beta$ CD:PNT)1:1, b) ( $\beta$ CD:PNT)2:1, c) ( $\beta$ CD:PNT)3:1 and d) ( $\beta$ CD:PNT)4:1.....	87
<b>Figura 35:</b> Ressonância Magnética Nuclear 2D ROESY para o sistema ( $\beta$ CD:PNT)1:1 em D <sub>2</sub> O.....	88
<b>Figura 36:</b> Expansão do espectro de RMN 2D ROESY para o sistema ( $\beta$ CD:PNT)1:1 a) na região de 7,0-7,8 ppm e b) na região de 1,5-1,9 ppm.....	89
<b>Figura 37:</b> Representação esquemática de alguns dos possíveis sistemas formados entre $\beta$ CD e PNT, que coexistem em equilíbrio em solução.....	90

<b>Figura 38:</b> Cromatograma (HPLC) obtido para o Isotionato de Pentamidina em pH 2 para a amostra 1.....	<b>91</b>
<b>Figura 39:</b> Cromatograma (HPLC) obtido para o Isotionato de Pentamidina em pH 2 na presença de pepsina, após 14 horas de reação (amostra 61).....	<b>92</b>
<b>Figura 40:</b> Curvas termogravimétricas: a) $\beta$ CD, b) AS, c) ( $\beta$ CD:AS)1:1 e d) MM( $\beta$ CD:AS).....	<b>97</b>
<b>Figura 41:</b> Curva termogravimétrica para os precursores $\beta$ CD e AS e para os compostos ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1.....	<b>99</b>
<b>Figura 42:</b> Espectros vibracionais na região do infravermelho obtido para os precursores $\beta$ CD e AS e para os compostos ( $\beta$ CD:AS)1:1 e MM( $\beta$ CD:AS).....	<b>100</b>
<b>Figura 43:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura para: a) AS, b) ( $\beta$ CD:AS)1:1 (zoom 2500), c) ( $\beta$ CD:AS)2:1 (zoom 5000), d) ( $\beta$ CD:AS)1:1 (zoom 4000), e) ( $\beta$ CD:AS)2:1 (zoom 6000) e f) ( $\beta$ CD:AS)1:1 (zoom 30000).....	<b>102</b>
<b>Figura 44:</b> Espectro (IES (-)-EM) obtido para $\beta$ CD.....	<b>103</b>
<b>Figura 45:</b> Espectro (IES (-)-EM) obtido para AS.....	<b>104</b>
<b>Figura 46:</b> Representação esquemática do processo de hidrólise do fármaco AS, formando DHA e ácido succínico.....	<b>105</b>
<b>Figura 47:</b> Espectro (IES (-)-EM) obtido para ( $\beta$ CD:AS)1:1.....	<b>105</b>
<b>Figura 48:</b> Espectro (IES (-)-EM) obtido para ( $\beta$ CD:AS)2:1.....	<b>106</b>
<b>Figura 49:</b> Espectro de RMN para o fármaco Artesunato (AS) obtido em DMSO- $d_6$ .....	<b>108</b>
<b>Figura 50:</b> Expansão do espectro de RMN para o fármaco AS obtido em DMSO- $d_6$ na região de 0,70 a 2,90 ppm.....	<b>109</b>
<b>Figura 51:</b> RMN de $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 para AS a 400MHz em DMSO $d_6$ .....	<b>110</b>
<b>Figura 52:</b> Expansão do mapa de contorno HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -DEPT 135 para o AS a 400MHz em DMSO.....	<b>111</b>
<b>Figura 53:</b> Expansão do mapa de contorno ROESY $^1\text{H}/^1\text{H}$ para AS a 400MHz em DMSO.....	<b>111</b>
<b>Figura 54:</b> Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 em DMSO- $d_6$ .....	<b>114</b>
<b>Figura 55:</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) na região de 5.53-5.76 ppm: a) $\beta$ -ciclodextrina, b) composto ( $\beta$ CD:AS)2:1, c) composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 e d) Artesunato.....	<b>116</b>

<b>Figura 56:</b> Ressonância Magnética Nuclear 2D ROESY para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1, obtido em DMSO $d_6$ 400MHz.....	<b>117</b>
<b>Figura 57:</b> Expansão do mapa de contorno 2D ROESY para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1, na região de 5,5-5,8 ppm.....	<b>118</b>
<b>Figura 58:</b> Espectro de RMN de difusão para o sistema ( $\beta$ CD:AS)1:1, a 400 MHz em DMSO- $d_6$ .....	<b>119</b>
<b>Figura 59:</b> Diagramas de solubilidade obtido por Higuchi e Connors.....	<b>122</b>
<b>Figura 60:</b> Eletroferogramas obtidos para as amostras 1, 5 e 13.....	<b>123</b>
<b>Figura 61:</b> Gráficos relacionando a área corrigida do pico de AS em função da concentração de $\beta$ CD para as amostras: a) de 1 a 13, b) de 1 a 13 réplica, c) de 1' a 13', d) de 1' a 13' réplica, e) de 1'' a 13'' e f) de 1'' a 13'' réplica.....	<b>124</b>
<b>Figura 62:</b> Espectros de absorção na região do infravermelho: a) 4,7-dicloroquinolina e b) cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida (CQT).....	<b>126</b>
<b>Figura 63:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz em DMSO- $d_6$ para: a) 4,7-dicloroquinolina e b) CQT.....	<b>128</b>
<b>Figura 64:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz em $\text{D}_2\text{O}$ para CQT.....	<b>129</b>
<b>Figura 65:</b> Curvas termogravimétricas obtidas para as amostras ( $\beta$ CD:CQT)1:1, ( $\beta$ CD:CQT)2:1, ( $\beta$ CD:CQT)/ $\text{H}_2\text{O}$ e MM( $\beta$ CD:CQT).....	<b>131</b>
<b>Figura 66:</b> Espectros vibracionais obtidos na região do infravermelho para as amostras ( $\beta$ CD:CQT)1:1, ( $\beta$ CD:CQT)2:1, ( $\beta$ CD:CQT)/ $\text{H}_2\text{O}$ e MM( $\beta$ CD:CQT).....	<b>131</b>
<b>Figura 67:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz em DMSO- $d_6$ para: a) ( $\beta$ CD:CQT)1:1 e b) ( $\beta$ CD:CQT)2:1.....	<b>132</b>
<b>Figura 68:</b> Espectro de RMN 2D ROESY obtido em $\text{D}_2\text{O}$ , para o sistema ( $\beta$ CD:CQT)1:1.....	<b>133</b>
<b>Figura 69:</b> Curvas TG e DTA para: a) $\alpha$ CD, b) CQT, c) ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 e d) MM( $\alpha$ CD:CQT).....	<b>135</b>
<b>Figura 70:</b> Espectros vibracionais na região do infravermelho obtido para os precursores $\alpha$ CD e CQT e para os compostos ( $\alpha$ CD:AS)1:1 e MM( $\alpha$ CD:AS).....	<b>137</b>
<b>Figura 71:</b> Micrografias obtidas para: a) $\alpha$ CD com zoom de 600 vezes, b) $\alpha$ CD com zoom de 2000 vezes, c) CQT com zoom de 250 vezes, d) CQT com zoom de 2000 vezes, e) composto ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 com zoom de 2000 vezes e f) ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 com zoom de 15000 vezes.....	<b>139</b>
<b>Figura 72:</b> Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para a $\alpha$ CD obtido em $\text{D}_2\text{O}$ .....	<b>140</b>

<b>Figura 73:</b> Ressonância Magnética Nuclear $^1\text{H}$ para o composto ( $\alpha\text{CD}:\text{CQT}$ )1:1 em $\text{D}_2\text{O}$ .....	<b>141</b>
<b>Figura 74:</b> Mapa de contorno ROESY (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) para o composto de inclusão ( $\alpha\text{CD}:\text{CQT}$ )1:1.....	<b>143</b>
<b>Figura 75:</b> Expansão do mapa de contorno ROESY (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) para o composto de inclusão ( $\alpha\text{CD}:\text{CQT}$ )1:1, na região de 7,00 a 9,00 ppm.....	<b>144</b>
<b>Figura 76:</b> Proposta estrutural para o complexo ( $\alpha\text{CD}:\text{CQT}$ )1:1.....	<b>144</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Esquema de preparação das amostras para realização do teste de solubilidade de AS na presença de $\beta$ CD, por eletroforese capilar.....	<b>50</b>
<b>Tabela 2:</b> Composição dos vials para análise por Eletroforese Capilar.....	<b>54</b>
<b>Tabela 3:</b> Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ ( em 400MHz) de prótons da Pentamidina no fármaco livre e na presença de $\beta$ CD, usando $\text{D}_2\text{O}$ e valores $\Delta\delta$ .....	<b>86</b>
<b>Tabela 4:</b> Descrição do tratamento dos grupos de camundongos com especificação das formulações e doses administradas.....	<b>93</b>
<b>Tabela 5:</b> Atribuição, número de hidrogênios ( $N^\circ$ ), multiplicidade(*) e deslocamento químico ( $\delta$ ) dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ do fármaco AS livre e dos compostos ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1 (400 Hz, $\text{DMSO-}d_6$ ).....	<b>112</b>
<b>Tabela 6:</b> Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (em 400MHz) de prótons do Artesunato no fármaco livre e na presença de $\beta$ CD, usando $\text{DMSO-}d_6$ e valores $\Delta\delta$ .....	<b>115</b>
<b>Tabela 7:</b> Avaliação da atividade citotóxica de AS, $\beta$ CD e ( $\beta$ CD:AS)1:1 utilizando o ensaio de MTT e duas linhagens celulares: BGM (célula renal de macaco) e HepG2 (hepatoma humano).....	<b>125</b>
<b>Tabela 8:</b> Tentativa de atribuição das principais bandas do espectro vibracional obtido na região do infravermelho para CQT (em $\text{cm}^{-1}$ ).....	<b>127</b>
<b>Tabela 9:</b> Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (em 400MHz) de prótons do CQT livre e na presença de $\alpha$ CD, usando $\text{D}_2\text{O}$ e valores $\Delta\delta$ .....	<b>142</b>
<b>Tabela 10:</b> Atividade <i>in vivo</i> de CQT contra <i>P. berghei</i> , foram utilizados os controle $\beta$ -Ciclodextrina e cloroquina.....	<b>145</b>
<b>Tabela 11:</b> Avaliação da atividade citotóxica, utilizando o ensaio de MTT e duas linhagens celulares: BGM (célula renal de macaco) e HepG2 (hepatoma humano).....	<b>146</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Pesquisa realizada na Web of Science sobre o número de artigos publicados envolvendo ITC, até maio de 2013.....	<b>66</b>
<b>Gráfico 2:</b> Índice de parasitemia no Fígado.....	<b>94</b>
<b>Gráfico 3:</b> Índice de parasitemia no Baço.....	<b>95</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**$\beta$ CD:**  $\beta$ -ciclodextrina

**$\alpha$ CD:**  $\alpha$ -ciclodextrina

**PNT:** isotionato de pentamidina

**AS:** artesunato

**DHA:** diidroartemisinina

**SUC:** ácido succínico

**CQT:** 1-(7-cloroquin-4-il)tiossemicarbazida

**D<sub>2</sub>O:** óxido de deutério

**DMSO-d<sub>6</sub>:** dimetil sulfóxido deuterado

**CH<sub>3</sub>CN:** acetonitrila; d = 0,775-0,778 g/cm<sup>3</sup>

**CI:** composto de inclusão

**MM:** mistura mecânica

**( $\beta$ CD:PNT)1:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e PNT na proporção molar de 1:1.

**( $\beta$ CD:PNT)2:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e PNT na proporção molar de 2:1.

**( $\beta$ CD:PNT)3:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e PNT na proporção molar de 3:1.

**( $\beta$ CD:PNT)4:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e PNT na proporção molar de 4:1.

**( $\beta$ CD:AS)1:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e AS na proporção molar de 1:1.

**( $\beta$ CD:AS)2:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e AS na proporção molar de 2:1.

**( $\beta$ CD:CQT)1:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e CQT na proporção molar de 1:1.

**( $\beta$ CD:CQT)2:1:** CI envolvendo  $\beta$ CD e CQT na proporção molar de 2:1.

**( $\beta$ CD:CQT)/H<sub>2</sub>O:** CI envolvendo  $\beta$ CD e CQT na proporção molar de 1:1 em H<sub>2</sub>O.

**( $\alpha$ CD:CQT)1:1:** CI envolvendo  $\alpha$ CD e CQT na proporção molar de 1:1.

**TG:** termogravimetria

**DTA:** análise térmica diferencial

**IV:** espectroscopia vibracional na região do infravermelho

**v:** estiramento

**$\delta$ :** deformação angular

**MEV:** Microscopia eletrônica de Varredura

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**ITC:** Titulação calorimétrica isotérmica

**IES-EM:** Espectrometria de massa com ionização por eletrospray

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	23
1.1	LEISHMANIOSE	23
1.1.1	Isotionato de pentamidina	26
1.2	MALÁRIA	28
1.2.1	Artesunato	31
1.2.2	Derivados quinolínicos	33
1.3	QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	37
1.4	CICLODEXTRINAS	38
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	43
2.1	REAGENTES	43
2.2	PARTE EXPERIMENTAL	45
2.2.1	Síntese do Cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida (CQT)	45
2.2.2	Preparação dos compostos de inclusão	46
2.2.2.1	Compostos envolvendo $\beta$ CD e PNT	46
2.2.2.2	Compostos envolvendo $\beta$ CD e AS	47
2.2.2.3	Compostos envolvendo $\beta$ CD e CQT	47
2.2.3	Estudo da estabilidade enzimática do fármaco PNT livre e na presença de $\beta$ CD	48
2.2.4	Teste de solubilidade para o sistema $\beta$ -ciclodextrina/Artesunato	49
2.3	CARACTERIZAÇÕES	50
2.3.1	Análise Termogravimétrica	50
2.3.2	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho	51
2.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	51
2.3.4	Titulação Calorimétrica Isotérmica	51
2.3.5	Eletroforese Capilar	52
2.3.6	Cromatografia líquida de alta eficiência	55
2.3.7	Espectrometria de massa com ionização por eletrospray	55
2.3.8	Ressonância Magnética Nuclear	55

<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO: SISTEMA <math>\beta</math>- CICLODEXTRINA/ISOTIONATO DE PENTAMIDINA</b>	57
3.1	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	57
3.2	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	60
3.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	62
3.4	TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA	63
3.5	ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY	75
3.6	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	79
3.7	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO PNT LIVRE E NA PRESENÇA DE $\beta$ CD	90
3.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA EM MODELO DE LEISHMANIOSE VISCERAL MURINO	92
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO: SISTEMA <math>\beta</math>- CICLODEXTRINA/ARTESUNATO</b>	96
4.1	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	97
4.2	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	99
4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	101
4.4	ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY	103
4.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	107
4.6	ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE AS POR ELETROFORESE CAPILAR	120
4.7	ENSAIOS BIOLÓGICOS	125
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO: SISTEMA CICLODEXTRINA/4,7-CLOROQUINOLINO- TOSSEMICARBAZIDA</b>	126
5.1	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	134

5.2	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	136
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	138
5.4	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	139
5.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS	145
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	147
	<b>REFERÊNCIAS</b>	150
	<b>ANEXO I – PUBLICAÇÃO</b>	169

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas representam um problema global de saúde pública, sendo constituídas por um grupo de doenças tropicais, endêmicas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina. (Bardosh, Thys *et al.*, 2011; Leslie, 2011) De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, pertencem a esse grupo malária, tuberculose, doença de Chagas, dengue, esquistossomose, hanseníase e leishmaniose, as quais causam entre 500.000 e 1 milhão de óbitos anualmente. (World Health Organization, 2013)

O termo doenças negligenciadas foi utilizado pela primeira vez na década de 1970, com o lançamento do programa “The Great Neglected Diseases of Mankind” por Kenneth Warren, diretor da área de saúde da Fundação Rockefeller. Inicialmente o termo indicava baixo investimento em pesquisas na área, em comparação a doenças globais como câncer. Entretanto, a partir do ano 2000 os Médicos Sem Fronteiras e a DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*) lançaram a noção de que as referidas doenças eram negligenciadas, sobretudo, pelas indústrias farmacêuticas, cuja pesquisa e desenvolvimento é orientada sempre pelo lucro, estando o setor industrial privado focado nas doenças globais, para as quais medicamentos podem ser produzidos e comercializados com geração de lucros. (World Health Organization, 2013)

Particularmente, doenças tropicais causadas por protozoários tais como as leishmanioses e malária são responsáveis por considerada mortalidade e morbidade, afetando mais de 300 milhões de pessoas no mundo anualmente, com relevantes consequências sociais e econômicas. (Greenwood e Mutabingwa, 2002; Jain, Khan *et al.*, 2005; Vieites, Smircich *et al.*, 2008) Para ambas protozooses as dificuldades ao tratamento impõem limites ao controle destas parasitoses e reforçam a necessidade impreterível de pesquisa de alternativas terapêuticas com baixa toxicidade e alta eficácia.

### 1.1. LEISHMANIOSE

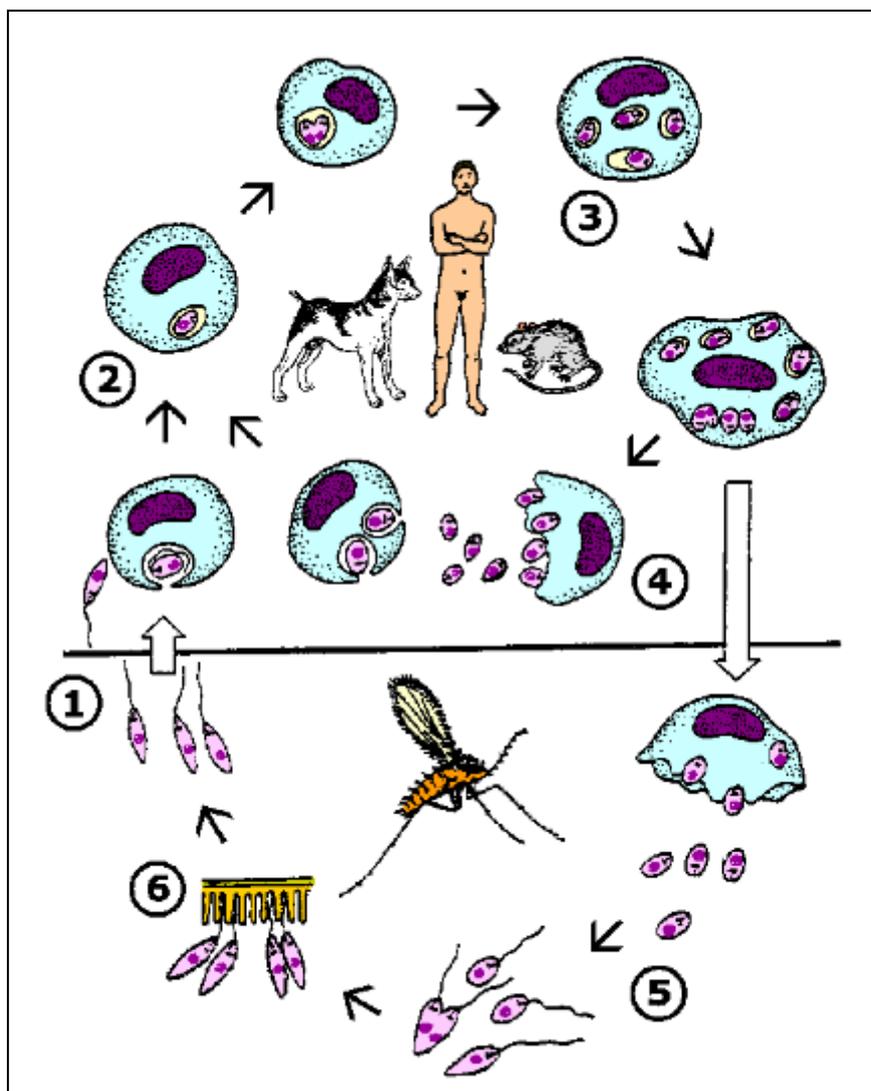
A Leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com manifestações clínicas dependentes da virulência da espécie infectante, susceptibilidade do hospedeiro e co-infecções, sendo divididas em Leishmaniose cutânea e mucocutânea que se caracterizam por lesões na pele e

leishmaniose visceral, que pode ser fatal. (Mishra, Saxena *et al.*, 2007) A Organização Mundial de Saúde considera a leishmaniose uma das mais sérias doenças causadas por protozoários, com aproximadamente 14 milhões de novos casos no mundo. (World Health Organization - Malaria, 2013).

O ciclo biológico de *Leishmaniasis spp* está representado na Figura 1. Os parasitas apresentam em seu ciclo biológico apenas duas formas evolutivas: a forma amastigota, que é imóvel e intracelular e a forma promastigota flagelada e extracelular. A doença é transmitida ao hospedeiro mamífero através da picada de fêmeas de vetor flebotomíneo infectado com as formas promastigotas de *Leishmania* (etapa 1). No mamífero, estas são fagocitadas por macrófagos ou células dendríticas e transformam em amastigotas (etapa 2), as quais multiplicam-se até que ocorra o rompimento dos macrófagos inicialmente infectados, quando então, as mesmas são liberadas e infectam novos macrófagos, resultando no desenvolvimento da doença (etapa 3). (Desjeux, 2001; Oliveira R.S.; Maciel, 2003; Bates, 2007)

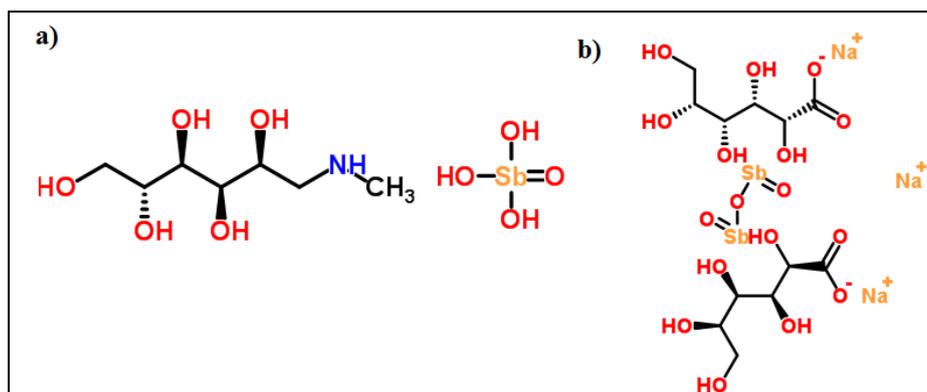
Quando o flebótomo pica um indivíduo infectado, aspira macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue, que passarão a evoluir no interior de seu tubo digestivo. Em aproximadamente 12 a 23 horas, quase todos os parasitas tornam-se promastigotas, e depois multiplicam-se por fissão binária (etapa 4). Tais promastigotas aderem-se ao trato digestivo dos flebotomos e para evitar serem excretados, causam uma obstrução mecânica, o que dificulta a ingestão de sangue pelo inseto. Após cada esforço por ingerir sangue, os músculos encarregados da sucção relaxam e provocam a regurgitação do material aspirado com os parasitas. Dessa forma, quando o inseto pica o hospedeiro vertebrado reinicia-se o ciclo (etapa 5). (Gossage, Rogers *et al.*, 2003)

Uma preocupação é a sobreposição da distribuição geográfica das leishmanioses e pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando a *Leishmania* um organismo oportunista. (Wolday, Berhe *et al.*, 1999; Cruz, Nieto *et al.*, 2006) A maioria dos casos de co-infecção registrados na América do Sul acontece no Brasil e essa dupla infecção produz efeito somatório na deficiência da resposta imune, uma vez que *Leishmania* e HIV destroem células do sistema imune, aumentando exponencialmente a intensidade e consequências das doenças. (Cruz, Nieto *et al.*, 2006)



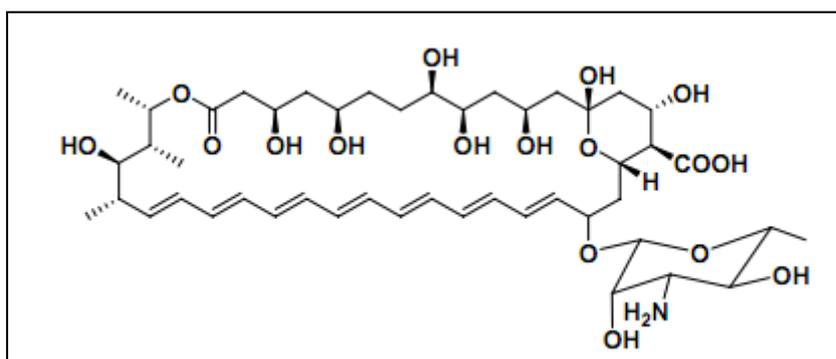
**Figura 1:** Ciclo biológico da *Leishmania* sp. Fonte: ([http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/ls\\_lc.html](http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/ls_lc.html) (acesso em 24 de março de 2013))

O tratamento de pacientes infectados com leishmaniose ainda representa um sério problema, uma vez que as opções de tratamento são limitadas. (Croft, Barrett *et al.*, 2005; Murray, Berman *et al.*, 2005) A escolha do tratamento depende da espécie do parasita, da sensibilidade aos fármacos, do tipo de estágio da doença e do estado imunológico do paciente. A quimioterapia convencional tem sido realizada com o uso de antimoniais pentavalentes ilustrados na Figura 2, que constituem os fármacos de primeira escolha, apesar de apresentarem eficácia limitada e algumas vezes significativa toxicidade, longo período de terapia e administração parenteral. (Nakayama, Loiseau *et al.*, 2005)



**Figura 2:** Estrutura química dos fármacos antimoniais: a) Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) e b) Estibogluconato de Sódio (Pentostan®).

Anfotericina B, Figura 3, e sais de pentamidina constituem alternativas à utilização dos antimoniais, entretanto apresentam efeitos tóxicos e a necessidade de administração por via parenteral. (Croft e Coombs, 2003; Nakayama, Loiseau *et al.*, 2005)



**Figura 3:** Estrutura química da Anfotericina B.

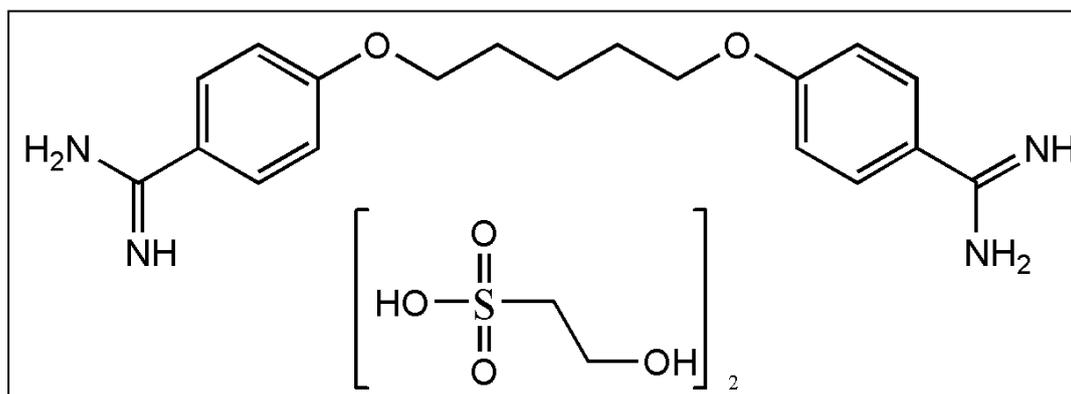
A administração oral tem a vantagem de reduzir as dificuldades sócio-econômicas que estão presentes em áreas endêmicas, onde os serviços de saúde são escassos. Ao longo dos últimos anos, hexadecilfosfocolina (HepC; miltefosina), um agente antineoplásico, foi identificado como o primeiro tratamento eficaz por via oral para a infecção de leishmaniose visceral. (Sundar e Murray, 2005)

#### 1.1.1. Isotionato de Pentamidina

O isotionato de 1,5-bis(4-amidinofenoxi)pentano, denominado PNT ilustrado na Figura 4, é uma diamina aromática sintetizada em 1940, (Ashley e H., 1942) que apresenta atividade antiprotozoária bem conhecida, (Nacher, Carme *et al.*, 2001; Croft e

Yardley, 2002) sendo o fármaco de segunda escolha mais recomendado em casos de resistência aos antimoniais (Croft e Yardley, 2002; Nakayama, Loiseau *et al.*, 2005) e casos de co-infecção com o vírus HIV. (Manfredi, Marinacci *et al.*, 2008) Seu mecanismo de ação não está claramente definido.

Uma característica relevante da PNT, se refere à protonação dos grupos amidínicos em pH fisiológico, que reduz a permeabilidade na membrana e conseqüentemente a atividade oral. (Docampo e Moreno, 2003) Desta forma, o fármaco requer administração parenteral, o que torna o tratamento pouco prático, já que grande parte dos pacientes residem em áreas rurais. (Puckowska, Bielawski *et al.*, 2004; Nakayama, Loiseau *et al.*, 2005) A PNT não atravessa a barreira hematoencefálica e une-se com rapidez aos tecidos depois da administração, sendo excretada por via renal. (Goodman e Gilman, 1996)



**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura do fármaco Isotionato de Pentamidina (PNT).

PNT é bem tolerada em muitos pacientes apesar de alguns efeitos adversos serem reportados, como a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e hipotensão. (Puckowska, Bielawski *et al.*, 2004; Nakayama, Loiseau *et al.*, 2005; Zolek e Maciejewska, 2010) Tais efeitos colaterais associados com o aumento da resistência dos protozoários à PNT tem motivado diversos grupos de pesquisa a investigarem a síntese de análogos. (Bakunova, Bakunov *et al.*, 2009; Bakunov, Bakunova *et al.*, 2010; Jarak, Marjanovic *et al.*, 2011) Outra alternativa amplamente utilizada para diversas classes de fármacos com o objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas e aumentar a eficiência, está relacionada à encapsulação. (Marques, 2011; Passos, 2011) Nesse contexto, a literatura documenta trabalhos envolvendo a encapsulação de PNT com lipossomas (Banerjee,

Nandi *et al.*, 1996; Siddiqui, Syed *et al.*, 2009) e nanopartículas. (Paul, Fessi *et al.*, 1997; Paul, Durand *et al.*, 1998) Em especial, a utilização de ciclodextrinas é uma interessante alternativa que tem sido aplicada a diversas classes de fármacos, sendo utilizadas em sistemas de liberação sofisticados. (De Sousa, Denadai *et al.*, 2010; Lula, De Sousa *et al.*, 2011)

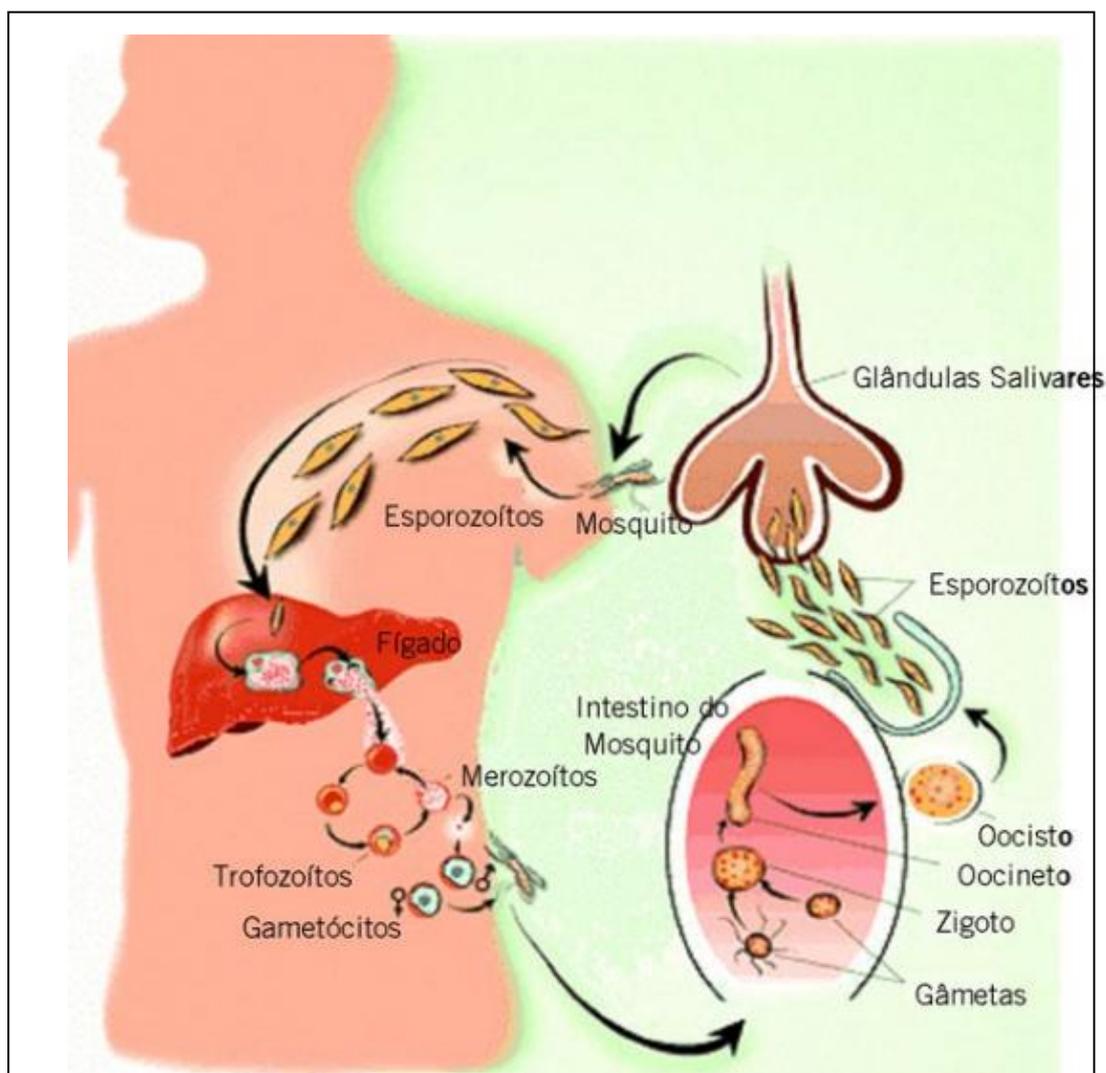
## 1.2. MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo que quatro espécies infectam o ser humano: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. falciparum*, sendo transmitidas pela picada de fêmeas de mosquitos anofelinos. Cada espécie de *Plasmodium* determina aspectos clínicos diferentes para a enfermidade, mas, em geral, os sintomas típicos são febre, náuseas e dores de cabeça, acompanhados de diarreia e vômitos. Na ausência de tratamento adequado, a doença pode progredir para situações mais graves que podem levar ao óbito, como a malária cerebral, anemia severa e disfunção de vários órgãos vitais. (World Health Organization - Malaria, 2013)

Como pode ser visto pelo ciclo de vida do parasita exposto na Figura 5, a infecção malárica inicia-se quando esporozoítos infectantes são inoculados no homem por mosquitos do gênero *Anopheles*. Essas formas parasitárias saem rapidamente da circulação sanguínea e se alojam nos hepatócitos, onde se transformam, multiplicam e originam esquizontes tissulares. Essa fase assintomática é denominada pré-eritrocítica e dura cerca de 5 a 15 dias. Em seguida, os esquizontes se rompem, cada qual liberando milhares de merozoítos que caem na circulação, invadem os eritrócitos e iniciam, assim, o ciclo eritrocítico. (Braga, Carvalho *et al.*, 2002; Hardman, 2003) Nos eritrócitos, a maioria dos parasitas se reproduz assexuadamente, originando merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que continuarão seu desenvolvimento no mosquito vetor.

Os eritrócitos contendo parasitas se rompem, cada qual liberando 6 a 24 merozoítos, sendo esse processo o responsável pelas crises febris. (Hardman, 2003) Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Anopheles* ingere as formas sanguíneas do parasita, mas somente os gametócitos são capazes de se desenvolver no inseto. No intestino do mosquito, o processo de gametogênese é estimulado, formando-

se zigotos. Essas formas do parasita se desenvolvem na parede do intestino do inseto e dão origem a esporozoítos infectantes, que se alojam nas glândulas salivares do mosquito, o qual pode, então, infectar outro hospedeiro humano. (Braga, Carvalho *et al.*, 2002; Hardman, 2003) A grande complexidade do ciclo de vida do parasita explica as enormes dificuldades para o desenvolvimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura. (Vale, 2005)



**Figura 5:** Ciclo de vida do parasita da malária humana - Fonte: (Vale, 2005).

A malária é considerada uma das mais importantes doenças tropicais devido à alta mortalidade e morbidade, afetando mais de 2 bilhões de pessoas em países endêmicos. A doença afeta principalmente populações de países em desenvolvimento, constituindo um obstáculo ao desenvolvimento econômico. (Araújo, 1999; De Sa, Costa

*et al.*, 2009; Tekete, Djimde *et al.*, 2009; Martino, Malet-Martino *et al.*, 2010; World Health Organization - Malaria, 2013)

O tratamento para essa doença é longo, complexo e muitas vezes ineficaz devido à reinfecção do paciente, fenômeno muito comum em regiões endêmicas. Isto acontece porque muitas das estratégias consideradas eficazes para o combate a malária são pouco acessíveis nos países endêmicos, como a educação da população de risco, a quimioterapia eficiente, o controle do vetor por meio de inseticidas e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas para evitar a infecção. (Soares e Rodrigues, 1998) Somando-se a isso e ao tratamento realizado de maneira extensiva e desordenada que ocasionou problemas de resistência aos diferentes esquemas terapêuticos utilizados, a ineficácia das vacinas e o desinteresse das grandes indústrias farmacêuticas em desenvolver fármacos baratos e acessíveis contra a doença, tornam a malária uma emergência global de saúde pública. (Khalil, Mohamed *et al.*, 2000; Witkowski, Berry *et al.*, 2009)

Os antimaláricos podem ser classificados pelo estágio do parasita no qual agem, pelas indicações clínicas de seu uso ou classe química. (Hardman, 2003) De acordo com o estágio do ciclo de vida do parasita no qual agem, os antimaláricos podem ser classificados em esquizotocidas sanguíneos, esquizotocidas teciduais, gametocidas e esporontocidas. (Sweetman, 2005) Os esquizotocidas sanguíneos agem nas fases eritrocíticas dos parasitas, que são diretamente responsáveis pelos sintomas clínicos da doença. Os esquizotocidas teciduais atuam nas fases exoeritrocíticas do parasita. São usados para profilaxia, prevenindo a invasão de células sanguíneas, e para evitar recaídas, levando à cura radical de infecções por *P. vivax* ou *P. ovale*. Os gametocidas destroem as formas sexuadas do parasita, interrompendo a transmissão da infecção ao mosquito vetor. Os esporontocidas não apresentam ação direta nos gametócitos no hospedeiro humano, mas previnem a esporogonia no mosquito. (Hardman, 2003; Sweetman, 2005)

Os compostos mais utilizados no tratamento da malária incluem desde derivados aril-aminoálcool (que incluem a quinina, guanidina, cloroquina, amodiaquina, mefloquina, e piperquina); passando por antifolatos (como pirimetamina, proguanil e sulfadoxina) até artemisinina e seus derivados (dihidroartemisinina, artesunato, artemeter e arteeter) que são atualmente os fármacos mais promissores devido à eficácia, rápido modo de ação e amplo espectro de atividade, embora apresentem baixa solubilidade em água. (Yang, Lin *et al.*, 2009)

### 1.2.1. Artesunato

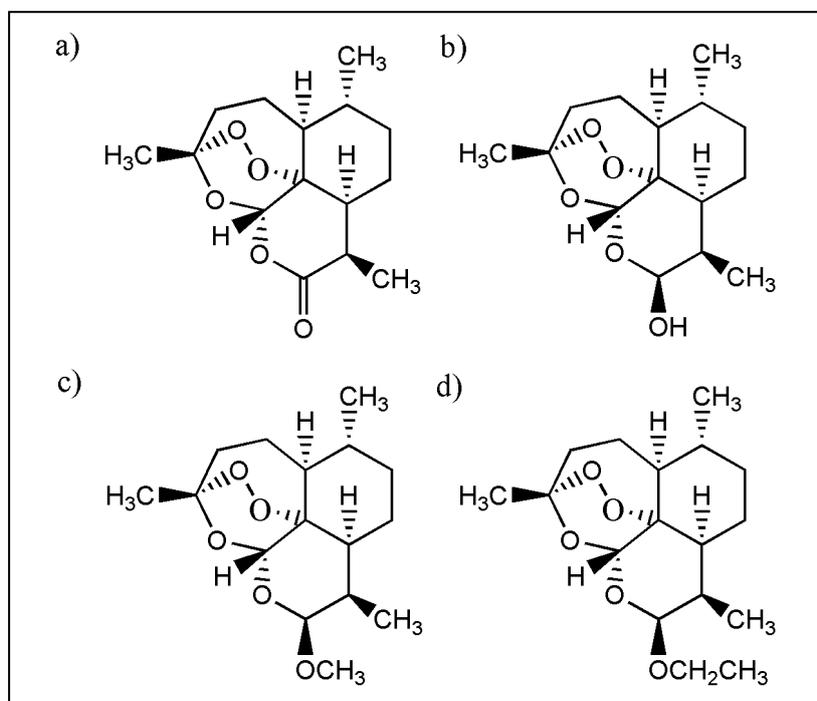
Os compostos a base de artemisinina, Figura 6a, são derivados da planta conhecida pelos chineses como *Artemisia annua* L, e utilizada com o propósito de “controlar e reduzir as febres”, (Klayman, 1985) sendo considerada atualmente a classe mais importante de antimaláricos. (World Health Organization - Malaria, 2013) A artemisinina foi isolada pelos pesquisadores chineses em 1972 e em 1979 teve sua estrutura elucidada, já em 1983 foi realizada a sua síntese total. (Robert e Meunier, 1998; Balint, 2001) Esta é uma sesquiterpena-lactona que apresenta como subunidade farmacofórica uma ligação peróxido pouco usual na sua estrutura, a qual determina uma importante atividade antimalárica, inclusive sobre cepas de *P. falciparum* multirresistentes. (Klayman, 1985) Entretanto, devido à sua baixa solubilidade e propriedades farmacocinéticas inadequadas ao uso terapêutico, vários análogos modificados foram sintetizados. A literatura reporta que artemisinina e seus derivados exercem atividade antimalárica mediante clivagem da ponte endoperóxido com formação de radicais livres e alquilação de proteínas específicas e fundamentais para a sobrevivência do parasita. (Van Agtmael, Eggelte *et al.*, 1999; Meshnick, 2002; Silva, 2006; Taranto, 2006)

As limitações de biodisponibilidade da artemisinina foram contornadas mantendo-se a unidade farmacofórica trioxânica e modificando-se os substituintes no carbono do grupamento cetona (C=O), o que deu origem aos análogos sintéticos que exibem maior atividade e são melhor absorvidos. (Rang, 2004) Dentre os derivados ativos, obtidos por semi-síntese, encontram-se a diidroartemisinina (DHA) (Figura 6b),  $\beta$ -arteméter (Figura 6c) e o arteéter (Figura 6d), bem como o artesunato ou ácido artesúnic (AS) ilustrado na Figura 7. (Robert e Meunier, 1998) É importante destacar a diidroartemisinina (DHA), a qual constitui o principal metabólito dessa classe de compostos. (Li, Peggins *et al.*, 1998; Posner, Paik *et al.*, 2007)

Em especial, o AS cuja nomenclatura IUPAC é (3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-decahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12*H*-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10-*o*1, hidrogeno succinato, é um derivado semi-sintético da artemisinina, o qual foi desenvolvido pela primeira vez na República Popular da China. (White, 2008) AS é preparado a partir da redução da lactona, fração não essencial da molécula, com boroidreto de sódio produzindo DHA, o qual apresenta grupamento hidroxila e através esterificação de Steglich, na presença de dicitloexilcarbodiimida e de

4, *N,N*-dimetilaminopiridina, obtém o éster da DHA com ácido succínico, originando o ácido artesúnico ou artesunato. ([http://www.quimica.com.br/quimica/index.php?sessao=reportagem&id=860&codigo\\_revis=505](http://www.quimica.com.br/quimica/index.php?sessao=reportagem&id=860&codigo_revis=505) -acesso em 22 de fevereiro de 2013)

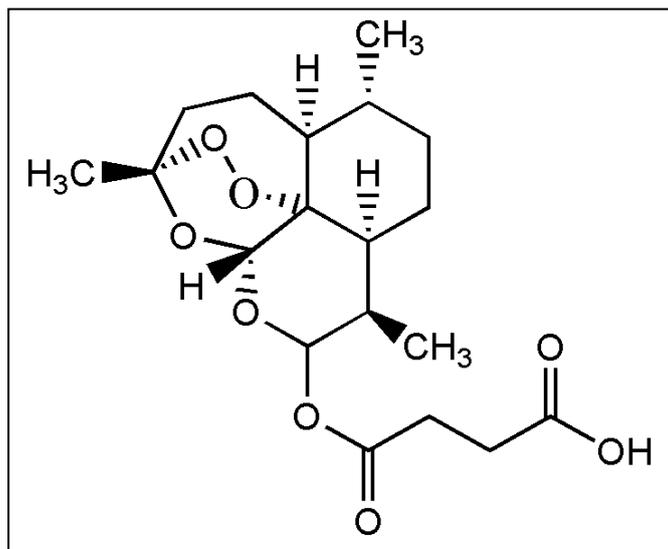
Em relação à artemisinina, o referido fármaco é mais solúvel em água sendo efetivo no tratamento de diversos casos de malária causada por *P. falciparum* resistente a diversos fármacos. (Karbwang, Bangchang *et al.*, 1992; Haynes e Krishna, 2004) Entretanto, AS é rapidamente transformado em diidroartemisinina (DHA), seu metabólito bioativo, em solução aquosa. (Batty, Ilett *et al.*, 1996; Brockman, Price *et al.*, 2000; Gabriels e Plaizier-Vercammen, 2004; Gaudin, Langlois *et al.*, 2007; Haynes, Ho-Wai *et al.*, 2007; Ellis, Amewu *et al.*, 2008)



**Figura 6:** Representação da artemisinina e seus derivados: a) Artemisinina, b) Diidroartemisinina (DHA), c) artemeter (AM) e d) arteéter (AE).

É amplamente utilizado como parte de terapias combinadas no sudeste da Ásia e cada vez mais na África para o tratamento de malária *P. falciparum*. De acordo com a Organização mundial de saúde, (World Health Organization - Malaria, 2013) AS é o fármaco de escolha para diversos tipos de malária, tanto em crianças quanto em adultos, onde sua transmissão é baixa. Em regiões onde a transmissão é elevada, os ensaios

clínicos entre adultos e crianças depende fortemente do uso de artesunato e quinina como o tratamento de escolha para a malária falciparum. (Burki, 2011) Seu custo relativamente elevado e demanda tornou o referido fármaco um alvo preferencial para os falsificadores. (Newton, Proux *et al.*, 2001) As limitações relacionadas à relativa baixa solubilidade em água do AS e conseqüentemente à baixa biodisponibilidade do mesmo são fatores que comprometem a sua utilização.



**Figura 7:** Representação esquemática da estrutura do fármaco Artesunato (AS).

A combinação de fármacos pouco solúveis com sistemas hospedeiros como as ciclodextrinas vem sendo utilizada para diversas classes de fármacos com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade dos mesmos. (Veiga *et al.*, 1996; Correia, Bezzene *et al.*, 2002; Pinto, Fraceto *et al.*, 2005; Lula, Gomes *et al.*, 2006; Grillo, Melo *et al.*, 2007; Calderini e Pessine, 2008; Passos, De Sousa *et al.*, 2011)

### 1.2.2. Derivados quinolínicos

Compostos contendo a porção quinolínica são bem conhecidos devido ao amplo espectro de atividades biológicas, com destaque para os fármacos antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antimaláricos. (Franck, Fournet *et al.*, 2004) Quinolinas correspondem a maior classe de alcaloides e desempenham um importante papel na área de produtos naturais e química medicinal. (Theeraladanon, Arisawa *et al.*, 2004) Os antimaláricos mais difundidos pertencem a este grupo, o qual foi considerado o que

atingiu o maior sucesso para tratamento e profilaxia da malária, (Robert, Benoit-Vical *et al.*, 2001) embora o desenvolvimento de resistência dos parasitas a estes, tenha tornado os derivados de artemisinina os fármacos de primeira escolha. (Diawara, Gbaguidi *et al.*, 2011)

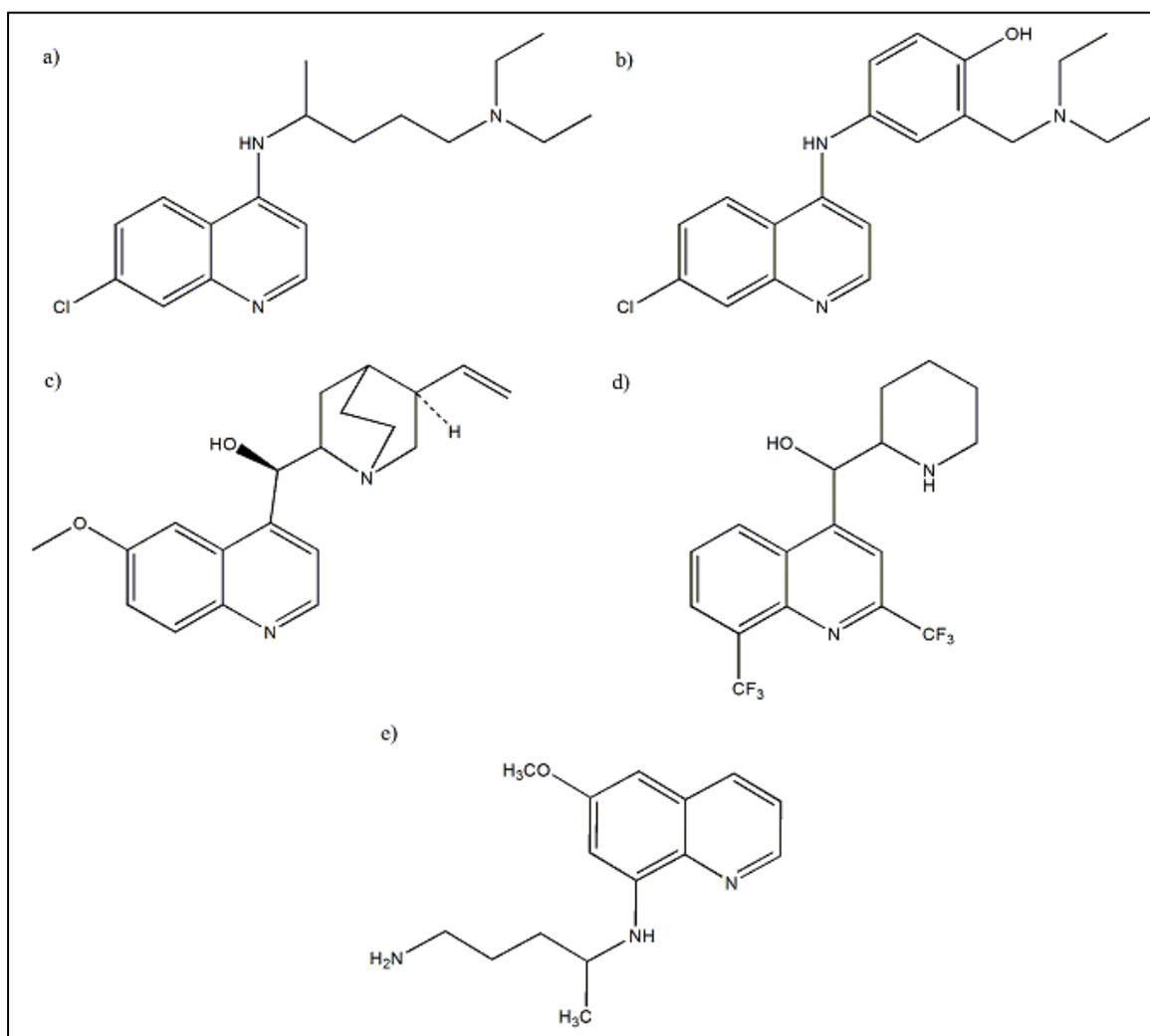
Os derivados quinolínicos são facilmente sintetizados, possuem preço acessível e são, geralmente, bem tolerados. Compõem esse grupo: quinina; mefloquina; amodiaquina; primaquina; cloroquina; etaquina; hidroxicloroquina; plasmoquina, dentre outros, (Valente, 2010) dos quais os principais encontram-se ilustrados na Figura 8.

A quinolina foi isolada pela primeira vez por Runge em 1834 a partir da destilação do alcatrão e foi denominada “Leukol”. Em especial, a quinina, que foi a primeira quinolina isolada e utilizada como fármaco contra malária, constitui o princípio ativo da casca da *Chinchona spp* a qual foi introduzida na Europa, vinda da América do Sul, no século XVII. (Rang, 2004) Apesar de apresentar o maior período de uso efetivo, teve sua resposta terapêutica bastante diminuída nos últimos anos, o que incentivou a busca por novos antimalaríais. Essa busca sempre esteve diretamente relacionada com a história das guerras, uma vez que os exércitos ficavam praticamente vulneráveis às epidemias de malária, causando preocupação dos militares em proteger suas tropas para que não houvessem muitas baixas provocadas pelo *Plasmodium*. (Cunico, Ferreira *et al.*, 2008)

Durante a II guerra mundial, com a dificuldade em encontrar o material bruto para extração da quinina, a síntese de análogos passou a ser incentivada. Particularmente, a cloroquina foi introduzida em 1944 e tornou-se a principal arma na terapia e prevenção da malária, principalmente devido a seu baixo custo, baixa toxicidade e significativa atividade contra todas as formas da malária. (Cunico, 2008) Outro derivado quinolínico de relevância é a mefloquina, a qual possui estrutura semelhante à quinina, mas sua meia-vida é maior, contribuindo provavelmente para o rápido desenvolvimento de resistência a este fármaco. (Noronha, 2000; Na-Bangchang, Bray *et al.*, 2007) Por esta razão a mefloquina deve ser usada em combinação com outros agentes antimaláricos. (Andrade, Varotti *et al.*, 2007)

Os fármacos antimaláricos são eficientes devido ao mecanismo de ação, pois se ligam fortemente a proteínas presentes no sangue, formando complexos que são tóxicos ao parasita. (Peters, 1998; Cunico, 2008) Quando a forma merozoíta se reproduz assexuadamente dentro das hemácias, os parasitas necessitam de uma enorme quantidade de nutrientes e, por terem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos,

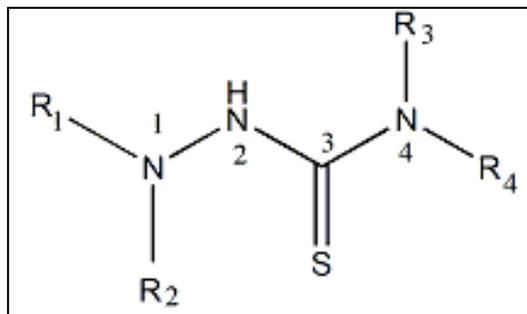
eles suprem suas necessidades pela degradação da hemoglobina humana. Durante este processo, que ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita, há também a liberação da hemina, que é tóxica ao parasita, devido a sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. Para evitar sua toxicidade, a hemina é polimerizada pelo parasita, formando um pigmento cristalino, insolúvel e não tóxico chamado hemozoína. (Cunico, 2008) Vários experimentos *in vitro* estabeleceram que fármacos antimaláricos quinolínicos agem por interferência na cristalização da hemozoína. (Sullivan, Matile *et al.*, 1998)



**Figura 8:** Representação esquemática da estrutura dos fármacos: a) cloroquina, b) amodiaquina, c) quinina, d) mefloquina e e) primaquina.

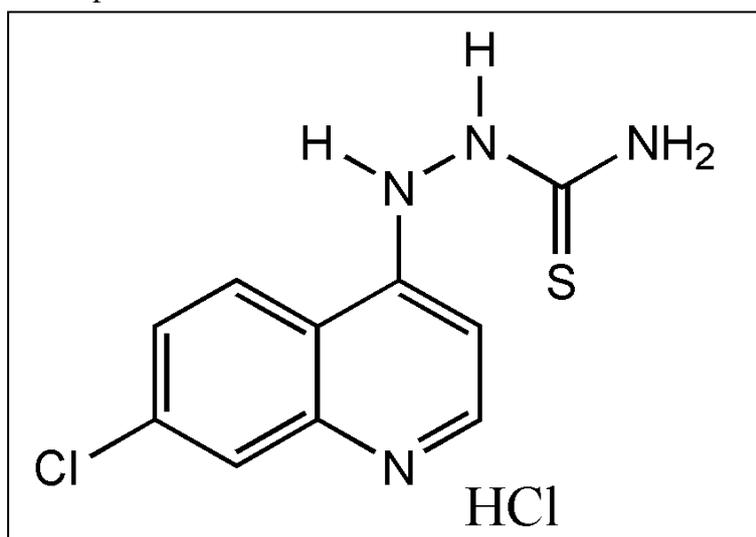
Adicionalmente, as tiossemicarbazidas, moléculas cuja estrutura genérica encontra-se representada na Figura 9, são moléculas que se caracterizam por apresentar um amplo perfil farmacológico, constituindo uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas. (Salgm-Goksen, Gokhan-Kelekci *et*

*al.*, 2007; Al-Saadi, Faidallah *et al.*, 2008; Farag, Mayhoub *et al.*, 2008; Siwek, Staczek *et al.*, 2011; Siwek e Stefanska, 2011; Siwek, Stefanska *et al.*, 2012) São muito descritas como precursores na preparação de tiossemicarbazonas, através da reação quimiosseletiva com aldeídos ou cetonas. (Tenório, 2005)



**Figura 9:** Estrutura genérica das tiossemicarbazidas, onde R1, R2, R3 e R4 = H, alquila, arila.

Baseado na potencial atividade antiprotozoária das tiossemicarbazidas descrita na literatura, alguns grupos se dedicam ao estudo da associação entre derivados quinolínicos e as referidas moléculas. (Keshk, El-Desoky *et al.*, 2008; Alam, Shaharyar *et al.*, 2011) Dentre tais estudos, se destaca o composto cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida, denominado CQT, exposto na Figura 10, relatado em uma patente alemã de 1964, (Heinz, 1964) na qual o autor evidencia as propriedades promissoras do composto sintetizado.



**Figura 10:** Representação esquemática da estrutura do potencial antimalárico cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida (CQT).

Entretanto, como o referido composto potencial antimalárico apresenta limitações com relação à baixa solubilidade em água, estudos envolvendo a associação

do mesmo e ciclodextrinas podem se tornar uma alternativa interessante no contexto da química supramolecular.

### 1.3. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

A Química Supramolecular tem se revelado um campo fértil e bastante promissor, devido a sua grande contribuição para diversas áreas do conhecimento como: química, física, biologia, materiais e bioquímica, (Lehn, 1973; , 1978; , 1985) recebendo crescente atenção em vários países, através do interesse no entendimento mais amplo e profundo de reações químicas que ocorrem principalmente nos processos biológicos.

Essa designação, química supramolecular, foi definida por Jean-Marie Lehn, Prêmio Nobel de 1987, como uma “química além da molécula”, ou seja, a química deve ser vista não somente como uma ciência de moléculas individuais formadas pela associação de átomos através de ligações covalentes, mas também como uma investigação de como estas moléculas se agrupam e interagem, em pequenos agregados moleculares, ou supermoléculas, de diferentes tamanhos e com propriedades específicas e para a compreensão das forças intermoleculares que estabilizam esses sistemas. (Lehn, 1978; Siegel, 1996) Dentre as diversas interações não covalentes que podem estar presentes em um determinado sistema, destacam-se as ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações dipolares e ainda interações eletrostáticas. (Rekharsky e Inoue, 1998; Szejtli, 1998)

Através da manipulação apropriada destas interações de natureza não covalente, a química supramolecular tem sido um dos campos mais interessantes da química moderna e transformou-se progressivamente na química da informação molecular, envolvendo estudos das características estruturais como os processos moleculares de auto-reconhecimento e auto-organização que representam a concepção básica da química molecular. (Lehn, 2002; Banerjee, Broeren *et al.*, 2004; Macdonald, Luo *et al.*, 2004) O conhecimento da auto-organização das estruturas dá acesso a um imenso número de materiais supramoleculares avançados, devido não somente à existência de uma intensa pesquisa relacionada a estes materiais, mas também ao apelo tecnológico que estes sistemas possuem e fornecem uma aproximação original à nanociência e à nanotecnologia. Hoje são conhecidos muitos sistemas supramoleculares envolvendo moléculas como os criptofanos, as ciclodextrinas e os calixarenos, e assim, o estudo de complexos formados por estas e fármacos, revela novas propriedades químicas, físicas e

biológicas. (Liu, Yang *et al.*, 2004; Szejtli, 2004; Schlick, Ding *et al.*, 2005; Greef e Meijer, 2008)

Entre as moléculas e sistemas estudados na química supramolecular encontram-se as ciclodextrinas, as quais são sistemas transportadores eficientes de biomoléculas que tem desempenhado um papel importante como sistemas de liberação, principalmente por suas características multifuncionais e a sua biocompatibilidade. (Davis e Brewster, 2004)

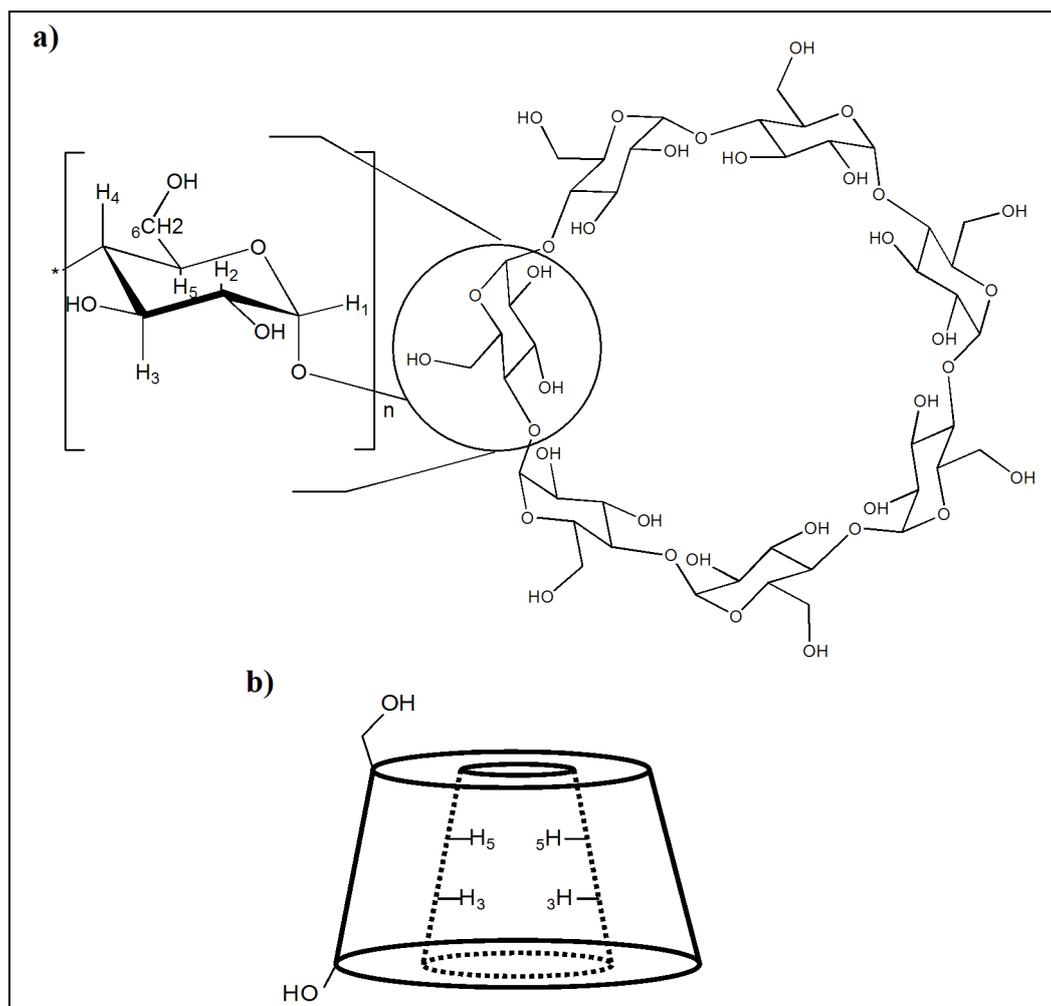
#### 1.4. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas foram descritas pela primeira vez em 1891 por Villiers, como um subproduto de uma reação de redução de dextrinas, a partir da digestão do amido. A partir de dados de cristalografia de raios X, foi determinado que as ciclodextrinas são compostos cíclicos formados de oligossacarídeos de  $\alpha$ -D-glicopiranoses unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -(1,4), contendo uma cavidade central com características hidrofóbicas e uma superfície externa com caráter hidrofílico e, devido à restrição de rotação ao redor das ligações entre as unidades glicopiranoses, as ciclodextrinas não são totalmente cilíndricas, possuindo uma forma de cone truncado. (Loftsson e Duchene, 2007). As ciclodextrinas mais comuns são a  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina, compostas de 6, 7 e 8 unidades de glicopiranoses, respectivamente. O cone molecular possui uma altura constante de 7,9 Å para as ciclodextrinas, enquanto que o diâmetro da cavidade interna varia em função do número de unidades glicosídicas. (Szejtli, 1998; Loftsson e Duchene, 2007)

Nas ciclodextrinas, as hidroxilas estão dispostas de modo que a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares é favorecida. As hidroxilas ligadas ao carbono 2 de uma unidade glicosídica interagem com as hidroxilas 3 das unidades vizinhas, contribuindo para o aumento da rigidez conformacional na molécula. (Szejtli, 1998) A  $\beta$ -ciclodextrina, cujo nome IUPAC é ciclo-hepta-glucoamilose, denominada  $\beta$ CD, está representada na Figura 11. A  $\beta$ CD apresenta as hidroxilas a uma distância onde todas possam estar comprometidas na formação de um cinturão de ligações de hidrogênio, explicando sua baixa solubilidade a 25 °C (18,5 gL<sup>-1</sup>), quando comparada às outras ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD 145,0 gL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ -CD 232,0 gL<sup>-1</sup> a 25°C). (Davis e Brewster, 2004; Szejtli, 2004).

A  $\beta$ CD é a ciclodextrina mais amplamente utilizada na complexação de várias classes de fármacos (Irie e Uekama, 1997; Loftson T., 2001; Davis e Brewster, 2004). No entanto, a administração parenteral das CDs e, particularmente da  $\beta$ CD, pode causar nefrotoxicidade devido à formação de um complexo de baixa solubilidade entre  $\beta$ CD e colesterol. Deste modo, foram desenvolvidas ciclodextrinas modificadas, de forma a melhorar as propriedades de carreamento e diminuir os efeitos tóxicos intrínsecos da  $\beta$ CD. Como exemplo destes derivados sintéticos das ciclodextrinas naturais pode-se citar a 2-hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ CD), o 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina e o sulfobutiléter de  $\beta$ -ciclodextrina. (Rajewski e Stella, 1996; Matioli, 2000)

Uma característica bastante peculiar das ciclodextrinas se refere ao caráter hidrofílico na porção externa e hidrofóbico na parte interna, permitindo que moléculas hidrofóbicas sejam incluídas na cavidade. (Del Valle, 2004) A formação de compostos de inclusão ocorre por meio de um processo de equilíbrio que pode ser quantitativamente descrito por uma constante de estabilidade ou associação ( $k_{a:b}$ ), onde  $a$  e  $b$  representam as razões molares entre o fármaco encapsulado e a ciclodextrina. (Uekama, Hirayama *et al.*, 1998) Essas características conferem as ciclodextrinas, capacidade de desempenhar vários tipos de interações intermoleculares, permitindo formar complexos supramoleculares que estabilizam e protegem as moléculas hóspedes do ambiente, aumentando também a biodisponibilidade dos fármacos.



**Figura 11:** Representação esquemática da  $\beta$ CD: a) monômero e b) visualização lateral do cone.

Como mencionado anteriormente, diversos sistemas de administração têm surgido com a finalidade de modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção e aumentar a estabilidade do fármaco. Tais formulações podem ser administradas pelas mais variadas vias, como por exemplo: injeção intramuscular, intravenosa e subcutânea, como formulação oral ou ainda como implantes. (Silva, Beraldo *et al.*, 1949) Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento e estudo de diferentes sistemas para a liberação controlada de fármacos, a administração por via oral não é favorável, devido as diferentes barreiras apresentadas no sistema gastrointestinal. (Goldberg e Gomez-Orellana, 2003) Dentre os problemas na administração por via oral, podem ser mencionadas a sua baixa solubilidade, devido ao grande tamanho e solubilidade característica. (Soares, De Albuquerque *et al.*, 2007) Desta forma, diversas alternativas para sistemas de liberação, visando à administração oral têm sido estudadas.

Adicionalmente aos sistemas poliméricos, a química supramolecular também tem sido amplamente empregada no desenvolvimento de sistemas carreadores de moléculas bioativas. (Hedges, 1998; Uekama, Hirayama *et al.*, 1998; Loftsson e Duchene, 2007)

A formação de complexos entre fármacos e ciclodextrinas melhora as características de liberação sem interferir na atividade do medicamento, por ser um processo reversível. Uma vez incluída na cavidade da ciclodextrina, a molécula hóspede pode ser liberada através de um processo de diluição do complexo ou pelo deslocamento competitivo com substâncias lipofílicas, endógenas no organismo, e que possuam melhor afinidade com a cavidade. (Loftson T., 2001) O deslocamento do hóspede da cavidade da ciclodextrina por substâncias endógenas ou exógenas no sítio ativo é responsável pela aceleração da absorção do fármaco pelo organismo. A ciclodextrina dissociada irá remover algumas substâncias da superfície das membranas, modificando as propriedades de transporte das mesmas e facilitando a absorção do fármaco.

É bem descrito na literatura que em solução aquosa ciclodextrinas e seus compostos de inclusão são capazes de se auto-organizarem, formando agregados. (Gonzalez-Gaitano, Rodriguez *et al.*, 2002; Messner, Kurkov *et al.*, 2010) CDs podem se organizar em diferentes agregados sob condição específica, (He, Fu *et al.*, 2008) e tais agregados estão em equilíbrio dinâmico com moléculas livres, (Duan, Zhao *et al.*, 2005) sendo essas estruturas montadas estabilizadas por interações hidrofóbicas, Van der Waals, ligações de hidrogênio e eletrostáticas. Estes agregados supramoleculares mostram propriedades promissoras para o encapsulamento de fármacos e podem ser considerados um fator adicional para explicar o perfil de liberação das moléculas de convidados da cavidade CDs. Uma vez que não só um sistema hóspede-hospedeiro precisaria ser quebrado, mas um grande número de ligações de hidrogênio e outras forças atrativas devem ser quebrados para liberar a molécula do fármaco. (De Sousa, Lima *et al.*, 2012) Neste sentido, várias técnicas físico-químicas têm sido empregadas para identificar estas estruturas montadas CDs em presença e ausência de moléculas hóspedes, a fim de correlacionar o tamanho do sistema, estrutura, morfologia e atividade biológica do fármaco. (Duan, Zhao *et al.*, 2005; He, Fu *et al.*, 2008; Messner, Kurkov *et al.*, 2010)

Com isto, motivados em reduzir efeitos indesejáveis causados pelos fármacos, diversos grupos de pesquisas tem se dedicado tanto na síntese de novas moléculas ativas quanto na tentativa de alterar propriedades físico-químicas dos fármacos já utilizados,

através de sistemas do tipo hóspede-hospedeiro, mantidos por interações intermoleculares amplamente descritas no contexto da química supramolecular. Em especial os fármacos PNT e AS, bem como o potencial antimalárico CQT, apresentam características indesejáveis como administração parenteral no caso de PNT e baixa solubilidade, no caso de AS e CQT, que podem ser alteradas através da encapsulação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados para preparação e caracterização dos compostos de inclusão, bem como suas propriedades físico-químicas estão listados abaixo

$\beta$ -ciclodextrina undeca hidratada ( $\beta$ CD):

Nomenclatura IUPAC: ciclo-hepta-glucoamilose.

Massa molecular:  $1135 \text{ g.mol}^{-1}$

Solubilidade em água a  $25^\circ\text{C}$ :  $15,9 \text{ m.mol/L}$

Ponto de fusão:  $224^\circ\text{C}$

Característica: Sólido branco cristalino

Fabricante: Xiamen Mchem Pharma LTD.

Lote: 20031210

Isotionato de Pentamidina (PNT):

Nomenclatura IUPAC: isotionato de 1,5-bis(4-amidinofenoxi)pentano

Massa molecular:  $592,69 \text{ g.mol}^{-1}$

Solubilidade em água a  $25^\circ\text{C}$ :  $100 \text{ mg/mL}$

Ponto de fusão:  $188-194^\circ\text{C}$

Característica: Sólido branco semicristalino

Fabricante: Aldrich

Lote: 079178N

Artesunato (AS):

Nomenclatura IUPAC: (3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-decaidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12*H*-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10-*o*1, hidrogeno succinato

Massa molecular:  $384,43 \text{ g.mol}^{-1}$

Solubilidade em água a  $25^\circ\text{C}$ :  $< 1 \text{ mg/mL}$

Ponto de fusão:  $135^\circ\text{C}$

Característica: Sólido branco semicristalino

Fabricante: Aldrich

Lote: 099k1322

Devido ao custo elevado do artesunato da fabricante Aldrich, o qual inviabilizaria a realização dos estudos em sistemas envolvendo ciclodextrina, aproximadamente 50 g do referido fármaco foi gentilmente cedido pela FIOCRUZ. A pureza deste foi verificada usando experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida (CQT).

Nomenclatura IUPAC: cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida.

Massa molecular: 289,18 g.mol<sup>-1</sup>

Solubilidade em água a 25°C: 1,5 mg/mL

Ponto de fusão: 236-248°C

Característica: Sólido amarelo

Outros reagentes e solventes utilizados:

4,7-dicloroquinolina: Sigma-Aldrich

Tiossemicarbazida: Sigma-Aldrich

Ácido acético: Reagentes analíticos Dinâmica

$\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD): Aldrich, lote: 019k1090

Água Milli-Q®- Millipore

Óxido de Deutério (D<sub>2</sub>O): Cambridge Isotope Laboratories, Inc – 99,9% de pureza isotópica

Dimetil-sufóxido (DMSO-d<sub>6</sub>): Cambridge Isotope Laboratories, Inc – 99,9% de pureza isotópica

Etanol: Reagente analítico Proquimios

Metanol: Reagente analítico Proquimios

Pepsina: Boehringer Mannheim Corporation, lote: 100911.

Lactato de sódio: padrão interno

Ácido succínico: padrão interno

Ácido ftálico: preparação do eletrólito

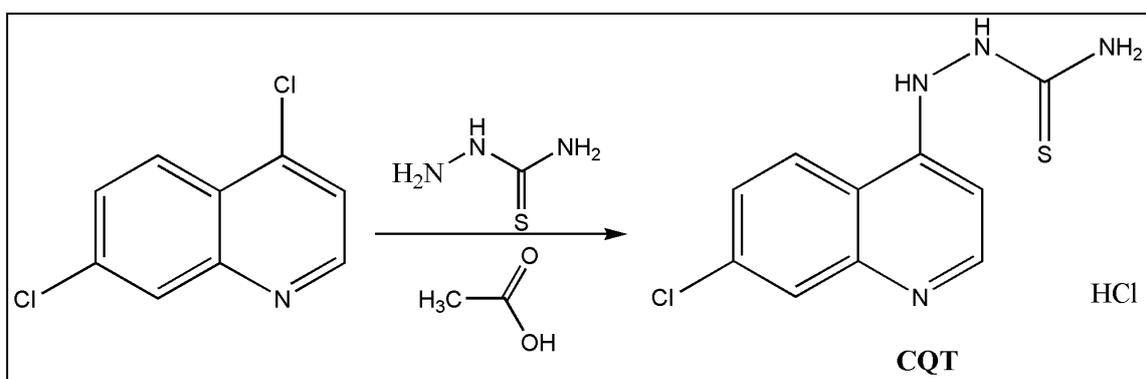
Tris(hidroximetil)aminometano: preparação do eletrólito

## 2.2. PARTE EXPERIMENTAL

Inicialmente a parte experimental apresentada na seção 2.2.1, refere-se à descrição da preparação do potencial antimalárico CQT e a seção 2.2.2. à preparação dos compostos de inclusão.

### 2.2.1. Síntese do Cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida (CQT)

O potencial antimalárico CQT foi sintetizado de acordo com procedimento descrito na literatura (Heinz, 1964). A metodologia de síntese é descrita abaixo sendo representada esquematicamente na Figura 12.



**Figura 12:** Síntese do cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il) tiossemicarbazida (CQT).

Em um Erlenmeyer solubilizou-se 1g (5,05 mmol) de 4,7-dicloroquinolina em 3mL de ácido acético. A solubilização não foi completa. O sistema foi então mantido sob aquecimento até a ebulição, quando verificou-se a completa solubilização do precursor. Um vidro de relógio foi utilizado sobre o Erlenmeyer. Após a ebulição, adicionou-se 0,46 g (5,05 mmol) de tiossemicarbazida, com verificação de uma reação instantânea e a formação de sólido alaranjado. O produto foi isolado por filtração e lavado com 5 mL de ácido acético para a remoção dos materiais de partida que não foram consumidos na reação. Posteriormente, procedeu-se a lavagem com 15 mL de éter dietílico para favorecer a precipitação do produto, com obtenção de 1,18 g do mesmo com rendimento de 81 %.

A escolha do material de partida 4,7-dicloroquinolina foi devido ao seu baixo custo, fácil aquisição e versatilidade na obtenção diferentes tipos de derivados. (De Souza, 2009)

### 2.2.2. Preparação dos compostos de inclusão.

Os compostos de inclusão envolvendo as moléculas hóspedes e a hospedeira foram preparados pelos métodos de liofilização ou “spray drying”, de acordo com suas características de solubilidade em água.

#### 2.2.2.1. Compostos envolvendo $\beta$ CD e PNT:

Como a molécula hóspede PNT apresenta alta solubilidade em água (100 mg/mL), decidiu-se pelo preparo dos compostos de inclusão usando o método de liofilização. O referido método consiste na solubilização da molécula hóspede PNT e da hospedeira  $\beta$ CD, em água. Após a mistura das duas soluções, o sistema foi mantido sob agitação por 4 horas, para que o sistema entrasse em equilíbrio dinâmico. Após este período de agitação, a solução foi congelada em nitrogênio líquido e submetida ao processo de liofilização, até a obtenção de um sólido completamente seco.

Foram preparados compostos nas proporções molares de ( $\beta$ CD:PNT)1:1, ( $\beta$ CD:PNT)2:1, ( $\beta$ CD:PNT)3:1 e ( $\beta$ CD:PNT)4:1. Para o sistema supramolecular preparado na proporção 1:1, adicionou-se 50 mg de PNT (84,4  $\mu$ mol) solubilizados em 25 mL de água em uma solução aquosa contendo 95,7 mg (84,4  $\mu$ mol) de  $\beta$ CD. Após 10 minutos, observou-se a solubilização completa de ambos, mantendo-se o sistema sob agitação por 4 horas. Após esse período, a solução foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizada.

De modo análogo ao sistema ( $\beta$ CD:PNT)1:1, os sistemas 2:1, 3:1 e 4:1 foram preparados seguindo-se o mesmo procedimento, porém foram utilizadas as proporções descritas abaixo:

Sistema ( $\beta$ CD:PNT)2:1: 50 mg de PNT (84,4  $\mu$ mol) e 191,5 mg(168,7  $\mu$ mol) de  $\beta$ CD;

Sistema ( $\beta$ CD:PNT)3:1: 50 mg de PNT (84,4  $\mu$ mol) e 287,3 mg(253,1  $\mu$ mol) de  $\beta$ CD;

Sistema ( $\beta$ CD:PNT)4:1: 50 mg de PNT (84,4  $\mu$ mol) e 383,0 mg(337,4  $\mu$ mol) de  $\beta$ CD;

Com o objetivo de comparação, uma mistura mecânica foi preparada através da mistura direta dos precursores, na razão molar de 1:1 ( $\beta$ CD:PNT), denominada MM( $\beta$ CD:PNT).

#### 2.2.2.2. Compostos envolvendo $\beta$ CD e AS:

Ao contrário do antileishmanico PNT, o fármaco AS apresenta solubilidade limitada em água (<1mg/mL), assim o método selecionado para preparação dos compostos de inclusão foi secagem por nebulização ou “spray drying”. O referido método consiste inicialmente na dissolução do artesunato em um solvente orgânico volátil. A solução orgânica é então nebulizada em uma câmara de secagem com ar quente, e as partículas formadas são recolhidas em um ciclone.

Para o sistema  $\beta$ -ciclodextrina:artesunato, foram preparados compostos nas proporções molares 1:1 e 2:1( $\beta$ CD:AS). O composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 foi preparado a partir de 50 mg (130,1  $\mu$ mol) de AS e 147,6 mg (130,1  $\mu$ mol) de  $\beta$ CD, solubilizados em uma mistura etanol-água com 60 % de etanol, em um volume total de 50 mL. O sistema foi deixado sob agitação por 8 horas. Após este período, a solução passou pelo processo de secagem em um “spray drying”.

Os parâmetros utilizados no equipamento foram:

- temperatura de saída: 107 °C
- temperatura de entrada: 78°C
- aspirador: 100%
- fluxo: 20%

Ao final, foram obtidos 55 mg de produto com rendimento de 25%.

O composto ( $\beta$ CD:AS)2:1 foi preparado sob as mesmas condições do ( $\beta$ CD:AS)1:1, porém partindo de 50 mg (130,1  $\mu$ mol) de AS e 295,2 mg (260,1  $\mu$ mol) de  $\beta$ CD. O rendimento foi de aproximadamente 30 %.

À mistura mecânica preparada através da mistura direta dos precursores  $\beta$ CD e AS, denominou-se MM( $\beta$ CD:AS).

#### 2.2.2.3. Compostos envolvendo $\beta$ CD e CQT:

De modo análogo, o composto de inclusão envolvendo CQT e  $\beta$ CD foi preparado pelo método de secagem por nebulização ou “spray drying”, devido à baixa solubilidade em água, como mencionado anteriormente. Para tanto, foram preparados compostos nas proporções molares 1:1 ( $\beta$ CD:CQT) e 2:1 ( $\beta$ CD:CQT). Inicialmente, o composto ( $\beta$ CD:CQT)1:1 foi preparado a partir de 100 mg (0,35 mmol) de CQT e 392,6 mg (0,35 mmol) de  $\beta$ CD, solubilizados em 50 mL de uma mistura organo-aquosa com

60% de etanol. O sistema foi mantido sob agitação por 24 horas e em seguida secado. Os parâmetros de secagem foram:

- temperatura de saída: 125°C
- temperatura de entrada: 63°C
- aspirador: 100%
- fluxo: 17 %

O composto ( $\beta$ CD:CQT)2:1, foi preparado sob as mesmas condições descritas para ( $\beta$ CD:CQT)1:1, entretanto partindo-se de 785,5 mg (0,69 mmol) de  $\beta$ CD. Por outro lado, com o intuito de comparar a influência do solvente orgânico no processo de inclusão para o referido sistema, preparou-se o composto envolvendo  $\beta$ CD e CQT em solução aquosa, na proporção 1:1, denominado ( $\beta$ CD:CQT)/H<sub>2</sub>O. Nesse caso, 100 mg de CQT foram solubilizados sob aquecimento a 60°C, em 50 mL de água e após a solubilização, adicionou-se 20 mL de solução aquosa contendo 392,6 mg de  $\beta$ CD, mantendo a agitação por 8 horas com ausência de aquecimento. O sistema se manteve translúcido, sem que houvesse precipitação, mesmo após resfriamento do mesmo. Posteriormente, a solução amarela resultante foi injetada no “spray drying” sob as mesmas condições descritas para ( $\beta$ CD:CQT)1:1.

Foram realizados ainda, estudos envolvendo a  $\alpha$ -ciclodextrina e a molécula CQT na proporção molar de 1:1, denominado ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, partindo-se de 100 mg de CQT e 336,6 mg de  $\alpha$ CD, e as mesmas condições experimentais descritas para ( $\beta$ CD:CQT)1:1.

Misturas mecânicas foram preparadas através da mistura direta dos precursores, nas mesmas razões molares dos compostos de inclusão, denominadas MM( $\beta$ CD:CQT) e MM( $\alpha$ CD:CQT).

### 2.2.3. Estudo da estabilidade enzimática do fármaco PNT livre e na presença de $\beta$ CD.

Realizou-se estudos relacionados à hidrólise enzimática de PNT, os quais foram realizados utilizando-se a enzima pepsina. A técnica cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para análise das amostras na presença da enzima pepsina. Poola, N.R. e colaboradores (Poola, Kalis *et al.*, 2003) descrevem os métodos analíticos para a análise de PNT por HPLC, os quais incluem a utilização de uma coluna

C-18 (2,1 x 250 cm), fase móvel contendo 76 % de solução de fosfato de potássio monobásico (pH ajustado para 3,2 com ácido fosfórico diluído) e 24% de acetonitrila grau HPLC. A taxa de fluxo da fase móvel deve ser de 1 mL/min e o comprimento de onda de detecção de 270 nm.

Preparou-se uma solução contendo PNT na concentração de 0,01 M (29 mg em 5mL de solução) em tampão pH = 2 (HCl/KCl), a qual permaneceu sob agitação em um balão. Em seguida, uma alíquota de 40 µL desta solução foi transferida para um eppendorf contendo 1 mL de solução tampão pH = 8,5 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). A solução resultante, denominada amostra 1, foi então congelada em nitrogênio líquido. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de pepsina na solução contida no balão e após um minuto transferiu-se 40 µL desta solução para um eppendorf contendo 1 mL de solução com tampão em pH = 8,5, para a qual denominou-se amostra 2, procedendo com o congelamento da mesma. E assim sucessivamente, alíquotas foram retiradas e as amostras foram preparadas em intervalos de 15 minutos, por 14 horas. Adotou-se este procedimento com o objetivo de cessar a degradação do fármaco nestas condições, uma vez que a enzima utilizada é inativada irreversivelmente na faixa de pH de 8-8,5, como descrito na literatura (Koufman e Johnston, 2012). As amostras de 1 a 61 foram posteriormente analisadas por HPLC.

#### 2.2.4. Teste de solubilidade para o sistema β-ciclodextrina/artesunato.

Estudos de solubilidade foram realizados para o sistema β-ciclodextrina/Artesunato em colaboração com professor Dr. Marcone Augusto de Oliveira Leal e o Dr. Fernando Antonio Simas Vaz, por eletroforese capilar de modo similar ao método proposto por Higuchi e Connors (Higuchi e Connors, 1965). O referido método relaciona o efeito de um agente solubilizante como a βCD sob a solubilidade de um fármaco. O experimento foi realizado adicionando-se um excesso de artesunato (3 mg de AS) a soluções com diferentes concentrações de βCD, de acordo com a Tabela 1. Foram preparadas 13 amostras, em triplicatas autênticas, totalizando 39 amostras, denominadas de 1 a13 para a primeira preparação das amostras, de 1' a 13' para a primeira réplica autêntica e de 1'' a 13'' para a segunda réplica autêntica, com a concentração de βCD variando de 0 a 0,012 mol/L.

**Tabela 1:** Esquema de preparação das amostras para realização do teste de solubilidade de AS na presença de  $\beta$ CD, por eletroforese capilar.

AMOSTRAS (3mg de AS)	VOLUME(mL)		CONCENTRAÇÃO DE $\beta$ CD (mol/L)
	H <sub>2</sub> O (mL)	$\beta$ CD 0,012 mol/L (mL)	
1	1,2	0	0
2	1,1	0,1	0,001
3	1,0	0,2	0,002
4	0,9	0,3	0,003
5	0,8	0,4	0,004
6	0,7	0,5	0,005
7	0,6	0,6	0,006
8	0,5	0,7	0,007
9	0,4	0,8	0,008
10	0,3	0,9	0,009
11	0,2	1,0	0,010
12	0,1	1,1	0,011
13	0	1,2	0,012

A mistura obtida foi mantida em um banho à temperatura constante de 25 °C por 12 horas e em seguida centrifugada. Alíquotas do sobrenadante foram recolhidas e o fármaco foi analisado pelo método analítico eletroforese capilar.

### 2.3. CARACTERIZAÇÕES

#### 2.3.1. Análise Termogravimétrica

As medidas termogravimétricas (TG/DTA) foram realizadas através de um equipamento TA Instruments SDT Q600, pertencente ao Laboratório de

Encapsulamento Molecular e Biomateriais, usando atmosfera de nitrogênio com fluxo de  $50 \text{ mL min}^{-1}$  e taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Todos os compostos foram analisados em uma faixa de 25 a  $700 \text{ }^\circ\text{C}$  em um cadinho de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

### 2.3.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Bomem FTIR MB – 102, pertencente ao Departamento de Química da UFJF, na região compreendida entre  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ; utilizando como suporte pastilhas de KBr. Os espectros foram obtidos com uma média de 64 varreduras e uma resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises morfológicas foram realizadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura no Centro de Microscopia da UFMG, utilizando um microscópio JEOL JSM, modelo 840A. Os sólidos foram dispersos em isopropanol e depositados sobre placas de silício fixadas sobre um suporte por fita condutora. Todas as amostras foram recobertas por um filme de Au.

### 2.3.4. Titulação Calorimétrica Isotérmica

As titulações calorimétricas da  $\beta\text{CD}$  com o antileishmanico PNT foram realizadas em triplicata em um microcalorímetro VP-ITC (Microcal Company, Northampton, MA, USA), a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, Campinas - SP. Cada titulação consiste de 50 injeções sucessivas com intervalos de 230 s entre cada ponto. O primeiro ponto da titulação de  $1 \mu\text{L}$ , foi descartado com o objetivo de eliminar efeitos de diluição do titulante na cela calorimétrica, as demais injeções de  $5 \mu\text{L}$  foram utilizadas para construir a curva de titulação. O experimento foi realizado utilizando uma solução aquosa de PNT  $30 \text{ mmol/L}$  como titulante e uma solução aquosa de  $\beta\text{CD}$   $1 \text{ mmol/L}$  como titulado. Experimentos de diluição da PNT  $30 \text{ mmol/L}$  (titulante) em água (titulado) foram realizados para verificar o comportamento do fármaco em solução, e utilizados como branco. Os dados termodinâmicos foram obtidos através da regressão não-linear da curva (Isoterma de Wiseman), assim os valores do coeficiente estequiométrico (N), da constante de ligação (K) e da variação de entalpia de reação ( $\Delta_r H^\circ$ ), foram obtidos. A

partir desses resultados, a variação da energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta_r G^\circ$ ) e a contribuição entrópica ( $T\Delta_r S^\circ$ ) foram obtidas, conforme descrito no capítulo 3, seção 3.4, onde a referida técnica é descrita com detalhes.

#### 2.3.5. Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica analítica instrumental baseada na migração diferenciada de compostos neutros, iônicos e ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico em uma solução eletrolítica conveniente contida em uma coluna capilar. A referida técnica foi utilizada para o estudo da solubilidade do fármaco AS na presença de  $\beta$ CD, como descrito na seção 2.2.4. deste capítulo. Os experimentos foram conduzidos em um sistema de CE (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, California, EUA) equipado com um detector por arranjo de diodos (UV-vis) , controle de temperatura e software para aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01). Foi utilizado um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), com 48.5 de comprimento total, 40.0 cm de comprimento efetivo, 50  $\mu$ m de diâmetro interno (DI) e 375 mm de diâmetro externo (DE).

As condições operacionais consistiram em: detecção indireta por UV em 220 nm, temperatura fixada a 25°C. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (20 mbar por 10 s) e o sistema eletroforético foi conduzido por polaridade normal e voltagem constante (+25 kV).

Para garantir a limpeza e a silanização da superfície interna do capilar foi realizado um condicionamento, que consistiu na passagem de: fluxo (flush) de NaOH 1,0 M por 5 minutos; flush com H<sub>2</sub>O por 10 minutos e flush com eletrólito por 15 minutos. Entre cada uma das corridas eletroforéticas, foi feito flush de eletrólito por 2 minutos.

Estudos preliminares indicaram como mais adequado o eletrólito constituído de ácido ftálico (10 mM) e tris(hidroximetil)aminometano (TRIS – 40 mM) pH 8,0.

As análises foram realizadas com a adição de padrão interno em todas as amostras para evitar que qualquer variação no sinal analítico, devido à erros de injeção ou detecção, ocorresse. Lactato de sódio foi selecionado como o melhor padrão interno para o sistema em estudo. Adicionalmente, utilizou-se um padrão de ácido succínico para auxiliar na identificação da hidrólise do fármaco.

O experimento foi planejado de modo similar ao método descrito por Higuchi e colaboradores (Higuchi e Connors, 1965) para o estudo da solubilidade de um determinado fármaco. Assim, as amostras foram preparadas em triplicatas autênticas, como descrito na seção 2.2.4. e a ordem de injeção destas foi sorteada, conforme Tabela 2. Em cada vial contendo 0,6 mL de amostra adicionou-se 12  $\mu$ L de lactato de sódio 100 mM, como padrão interno. Utilizou-se água deionizada para preparo das amostras, do eletrólito e no procedimento de lavagem dos capilares.

**Tabela 2:** Composição dos vials para análise por Eletroforese Capilar.

<b>VIAL</b>	<b>Composição</b>	<b>VIAL</b>	<b>Composição</b>
1	NaOH (1M)	25	Amostra 9'
2	H <sub>2</sub> O	26	Amostra 7'
3	Lixo	27	Amostra 1'
4	Eletrólito	28	Amostra 5'
5	Eletrólito	29	Amostra 10'
6	Eletrólito	30	Amostra 6'
7	Lixo	31	Amostra 4'
8	Amostra 11	32	Amostra 12'
9	Amostra 13	33	Amostra 8'
10	Amostra 2	34	Amostra 11''
11	Amostra 3	35	Amostra 13''
12	Amostra 9	36	Amostra 2''
13	Amostra 7	37	Amostra 3''
14	Amostra 1	38	Amostra 9''
15	Amostra 5	39	Amostra 7''
16	Amostra 10	40	Amostra 1''
17	Amostra 6	41	Amostra 5''
18	Amostra 4	42	Amostra 10''
19	Amostra 12	43	Amostra 6''
20	Amostra 8	44	Amostra 4''
21	Amostra 11'	45	Amostra 12''
22	Amostra 13'	46	Amostra 8''
23	Amostra 2'	47	Padrão suc + H <sub>2</sub> O
24	Amostra 3'	48	Padrão suc + amostra 9 + lactato

### 2.3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A referida técnica foi utilizada para o estudo da degradação do fármaco PNT livre e na presença de  $\beta$ CD. Para tanto, utilizou-se o equipamento Shimadzu com detector na região de ultra-violeta, pertencente à central analítica da UFMG.

Inicialmente, passou-se no equipamento uma solução  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , a qual foi substituída gradativamente pelo tampão em pH 3,2 (fosfato de potássio monobásico e ácido fosfórico diluído). A fase móvel passou por 10 minutos para que o sinal estabilizasse. Em seguida, a amostra 1 contendo apenas o fármaco em pH 2 foi injetada. O cromatograma indicou um tempo de retenção de 3,5 minutos, com o aparecimento de um pico nesse ponto. Deixou-se a fase móvel correr por 30 minutos para verificar se algum possível produto de degradação, com tempo de retenção maior, sairia nesse intervalo. Como nenhum outro pico foi observado, injetou-se a amostra 2, a qual contém PNT em pH 2 e pepsina, com 1 minuto de reação. Observou-se um pico com o mesmo perfil e mesmo tempo de retenção da amostra 1 e nenhum outro pico até 30 minutos. O mesmo comportamento foi observado para a amostra 61, obtida após 14 horas.

### 2.3.7. Espectrometria de Massa com Ionização por eletrospray (IES-EM)

Os espectros de massa com ionização por “electrospray” (IES-EM) para os sistemas envolvendo  $\beta$ CD/PNT e  $\beta$ CD/AS foram obtidos em um equipamento MS (modelo LCQ-Fleet, Thermo-Scientific, San Jose, CA, USA) acoplado a um analisador íon trap e operando nos modos positivo e negativo, pertencente ao Departamento de Química da UFMG. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de soluções aquosas foram injetadas diretamente dentro da fonte de íons por meio de um microcomputador. As seguintes condições foram utilizadas: taxa de fluxo de 20  $\text{mL min}^{-1}$ , temperatura de 27,5  $^{\circ}\text{C}$  no capilar; tensão IES de 5 kV. Tais experimentos foram realizados com a supervisão do doutorando Júlio César Cardoso da Silva.

### 2.3.8. Ressonância Magnética Nuclear.

Os compostos de inclusão preparados pelo método de liofilização ( $\beta$ CD/PNT) foram dissolvidos em  $\text{D}_2\text{O}$  e aqueles preparados por spray dryer ( $\beta$ CD/AS e  $\beta$ CD/CQT) foram dissolvidos em DMSO, com excessão de  $\alpha$ CD/CQT que foi dissolvida em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Tais amostras foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  e ROESY. Os fármacos livres foram estudados também por DEPT 135, Cosy  $^1\text{H}/^1\text{H}$  e HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ . Os espectros de RMN foram obtidos a 27,0 °C em equipamento Bruker DRX 400 – AVANCE operando a 400 MHz. Alguns dos experimentos de  $^1\text{H}$  foram adquiridos com a técnica de supressão de água residual (WATERGATE). Os dados de ROESY foram adquiridos através de experimentos padrões da biblioteca do espectrômetro com um tempo de mistura de 500 ms. A técnica DOSY foi utilizada para estudar o sistema envolvendo  $\beta\text{CD}$  e AS, sendo os experimentos realizados utilizando uma sequência de pulsos baseada em eco de spin, *p*-dioxano foi utilizado como referência interna, para corrigir erros acarretados pela instabilidade instrumental e erros sistemáticos devidos a alterações da viscosidade da solução. (Cabrita e Berger, 2001)

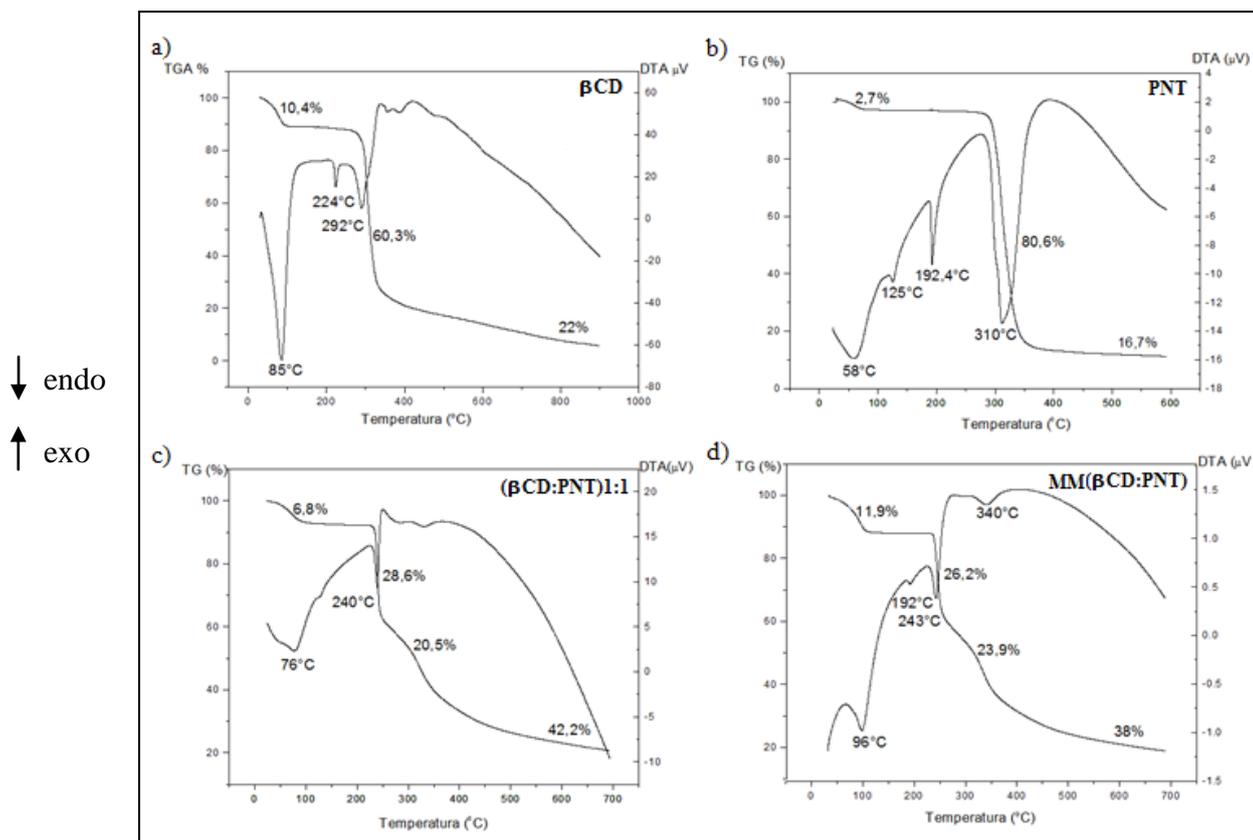
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO: SISTEMA $\beta$ -CICLODEXTRINA/ISOTIONATO DE PENTAMIDINA

Os resultados obtidos a partir das caracterizações dos compostos de inclusão formados entre  $\beta$ CD e PNT a diferentes razões molares, por análise termogravimétrica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, titulação calorimétrica isotérmica, espectrometria de massas com ionização por eletrospray e ressonância magnética nuclear, serão apresentados nesse capítulo. Adicionalmente, os resultados obtidos a partir dos estudos da estabilidade da PNT em solução, serão descritos. Por fim, na seção 3.7, são apresentados os resultados dos ensaios biológicos.

#### 3.1. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

As curvas termogravimétricas para o composto ( $\beta$ CD:PNT)1:1, bem como para a mistura mecânica MM( $\beta$ CD:PNT) e para os precursores,  $\beta$ CD e PNT, estão dispostas na Figura 13.

O perfil termoanalítico da  $\beta$ CD se caracteriza por dois eventos de perda de massa, sendo o primeiro deles na faixa de temperatura de 80-130°C referente à desidratação, com a saída de moléculas de H<sub>2</sub>O do interior da cavidade e da parte externa. Em seguida, observa-se um patamar de estabilidade térmica entre 140 e 290°C, seguido pela segunda perda de massa atribuída à sua termodecomposição. Na curva DTA três picos endotérmicos podem ser observados, o primeiro correspondendo à primeira perda de massa da curva TG, representa a desidratação da  $\beta$ CD. O segundo evento endotérmico é pouco intenso e não está associado a qualquer perda de massa, indicando um processo físico atribuído a fusão da  $\beta$ CD. (Yilmaz, Karadag *et al.*, 1995) O terceiro pico equivale à degradação da  $\beta$ CD.



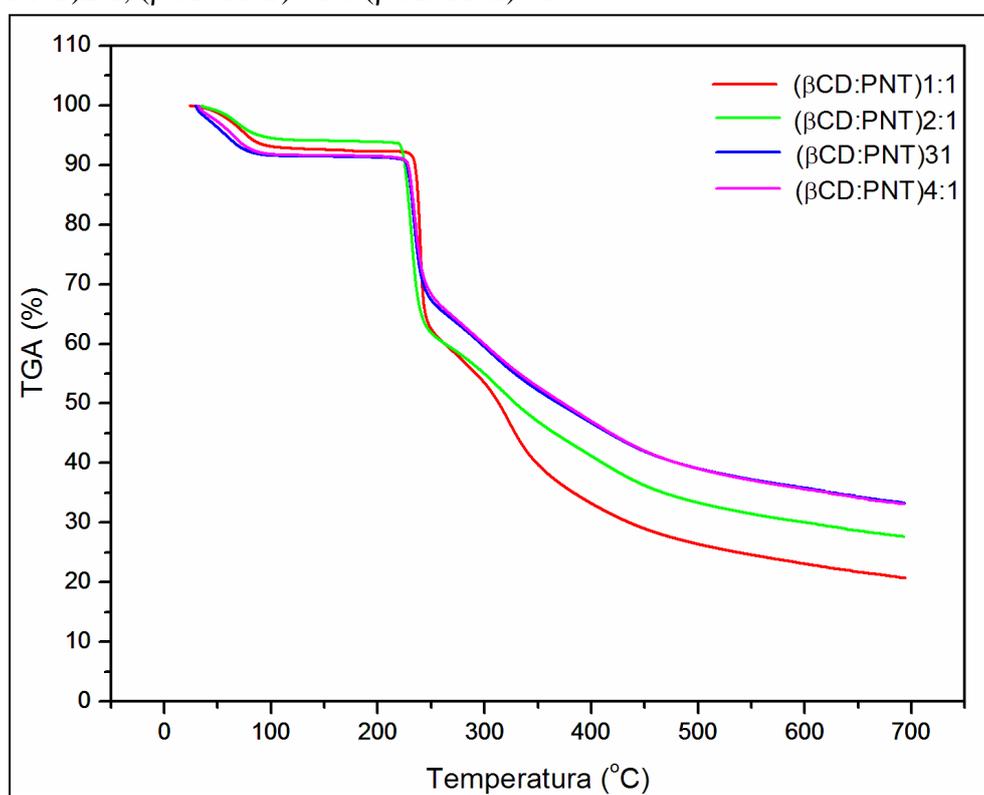
**Figura 13:** Curvas termogravimétricas: a)  $\beta$ CD, b) PNT, c)  $(\beta$ CD:PNT)1:1 e d) MM( $\beta$ CD:PNT)

A decomposição térmica do fármaco PNT, foi também estudada. Observa-se uma perda de massa significativa na faixa de 300-335°C, atribuída à termodecomposição do referido fármaco. Observa-se na curva DTA do fármaco PNT quatro eventos endotérmicos, sendo o pico endotérmico referente à fusão da PNT observado em 192,4 °C.

A análise termogravimétrica para o composto de inclusão  $(\beta$ CD:PNT)1:1 indicou que o referido composto apresenta uma maior estabilidade térmica em relação à mistura mecânica MM( $\beta$ CD:PNT), em uma faixa de temperatura de 89-230 °C. Pode-se observar na curva TG do composto  $(\beta$ CD:PNT)1:1 uma perda de massa de 6,8%, atribuída à saída de moléculas de água no referido composto. Após o patamar de estabilidade térmica, tem início uma nova etapa de decomposição em aproximadamente 230°C que continua até 246°C com perda de massa de cerca de 28%, a qual é referente ao início da termodecomposição da  $\beta$ CD. Em seguida observa-se uma terceira perda de massa de 20,5 % referente ao início da termodecomposição do fármaco e a formação de 42% de resíduo.

Na curva DTA, observa-se claramente que o comportamento térmico da mistura mecânica é um somatório do comportamento térmico dos precursores livres  $\beta$ CD e PNT, ao contrário do composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$ . A curva DTA do composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$ , não exibe o pico endotérmico relativo à fusão da PNT em  $192\text{ }^\circ\text{C}$ , ao contrário da curva DTA da mistura mecânica  $\text{MM}(\beta\text{CD}:\text{PNT})$ , em que se observam eventos endotérmicos em  $96, 192, 243$  e  $340\text{ }^\circ\text{C}$ . Por outro lado, a presença de apenas dois eventos na curva DTA do composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$ , indicam uma maior interação entre a macromolécula e o fármaco e fazem supor a existência de um complexo entre  $\beta$ CD e PNT, indicando a existência do composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$  no estado sólido.

A Figura 14 traz as curvas termogravimétricas dos compostos  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})2:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})3:1$  e  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})4:1$ .



**Figura 14:** Curva termogravimétrica para os compostos:  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})2:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})3:1$  e  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})4:1$ .

Através da comparação do comportamento térmico dos compostos preparados em diferentes proporções molares, observamos um comportamento muito similar, destacando a presença de eventos menos definidos na curva do composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})2:1$  em relação ao composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$ , indicando uma maior estabilidade térmica do composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})2:1$ . Entretanto não se observou diferenças

significativas nas curvas dos compostos ( $\beta$ CD:PNT)3:1 e ( $\beta$ CD:PNT)4:1 em relação à curva do composto ( $\beta$ CD:PNT)2:1, indicando que em tais sistemas as interações intermoleculares formadas entre a molécula hóspede e a hospedeira, são também muito similares.

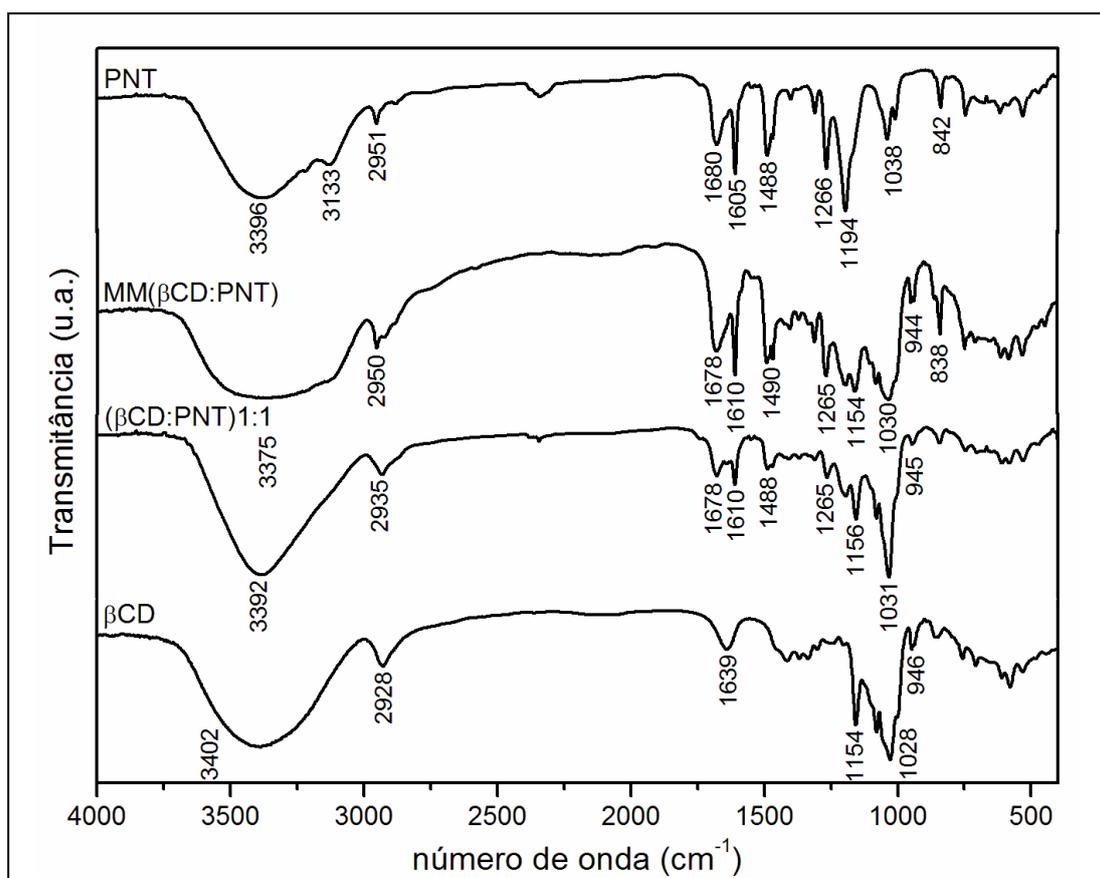
### 3.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para os precursores  $\beta$ CD e PNT, assim como para o composto denominado ( $\beta$ CD:PNT)1:1 e para a mistura mecânica MM( $\beta$ CD:PNT), são apresentados na Figura 15.

Através da análise do espectro vibracional da  $\beta$ CD, observou-se a presença de uma banda larga em  $3400\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento de várias ligações  $\nu(\text{O-H})$ , muitas delas envolvidas em ligações de hidrogênio, em  $2928\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda referente ao estiramento da ligação C-H, em  $1640\text{ cm}^{-1}$  uma banda correspondente à deformação de grupos O-H de moléculas de água da  $\beta$ CD pode ser observada. Em  $1153\text{ cm}^{-1}$  é observada uma banda atribuída ao estiramento assimétrico de C-O-C e de  $1060$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda intensa e larga atribuída aos estiramentos dos grupos C-C/C-O. A banda observada em  $947\text{ cm}^{-1}$  no espectro da  $\beta$ CD é relativa à vibração do anel da referida macromolécula. Tais atribuições foram realizadas com base em trabalhos descritos na literatura. (Egyed, 1990; Denadai, Santoro, Lopes *et al.*, 2006)

O espectro de absorção na região do infravermelho para PNT exhibe bandas bem definidas e alguns modos vibracionais merecem destaque como a banda observada em  $3396\text{ cm}^{-1}$  a qual é atribuída ao modo  $\nu(\text{O-H})$  das hidroxilas dos grupos isotionato e as bandas observadas em  $3133$  e  $2952\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas respectivamente ao estiramento das ligações N-H dos grupos amidínicos e C-H alifático. As bandas observadas em  $1680$  e  $1488\text{ cm}^{-1}$  são respectivamente atribuídas ao  $\nu(\text{C-O})$  e ao  $\nu(\text{C-C/C-N})$ . Já a banda observada em  $1194\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao modo de estiramento S=O do grupamento sulfonato.

Através da análise comparativa do espectro de absorção na região do infravermelho para o composto ( $\beta$ CD:PNT)1:1 em relação aos seus precursores  $\beta$ CD e PNT, verifica-se que algumas bandas do fármaco sofreram alterações após interação com a ciclodextrina.



**Figura 15:** Espectros vibracionais na região do infravermelho obtido para os precursores  $\beta$ CD e PNT e para os compostos  $(\beta$ CDPNT)1:1 e MM( $\beta$ CDPNT).

Nesse sentido, o espectro do composto  $(\beta$ CDPNT)1:1 exibe uma redução do número de modos vibracionais quando comparados ao espectro do fármaco PNT livre, indicando uma menor mobilidade da referida molécula e conseqüentemente sugerindo que a PNT está interagindo com a  $\beta$ CD. (Passos, De Sousa *et al.*, 2012) A principal mudança no modo vibracional da PNT está relacionada à vibração  $\nu(\text{C-C/C-N})$  observada em  $1488\text{ cm}^{-1}$ , a qual apresentou intensidade relativa menor em relação a outros modos vibracionais do fármaco no composto  $(\beta$ CDPNT)1:1, sugerindo uma interação com a  $\beta$ CD pela porção aromática, como esperado. Já a banda observada no espectro da PNT livre em  $3133\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao  $\nu(\text{N-H})$  aparece como um ombro no espectro da mistura mecânica e foi suprimida no espectro do composto  $(\beta$ CDPNT)1:1, reforçando os indícios da inclusão do fármaco PNT na cavidade da  $\beta$ CD.

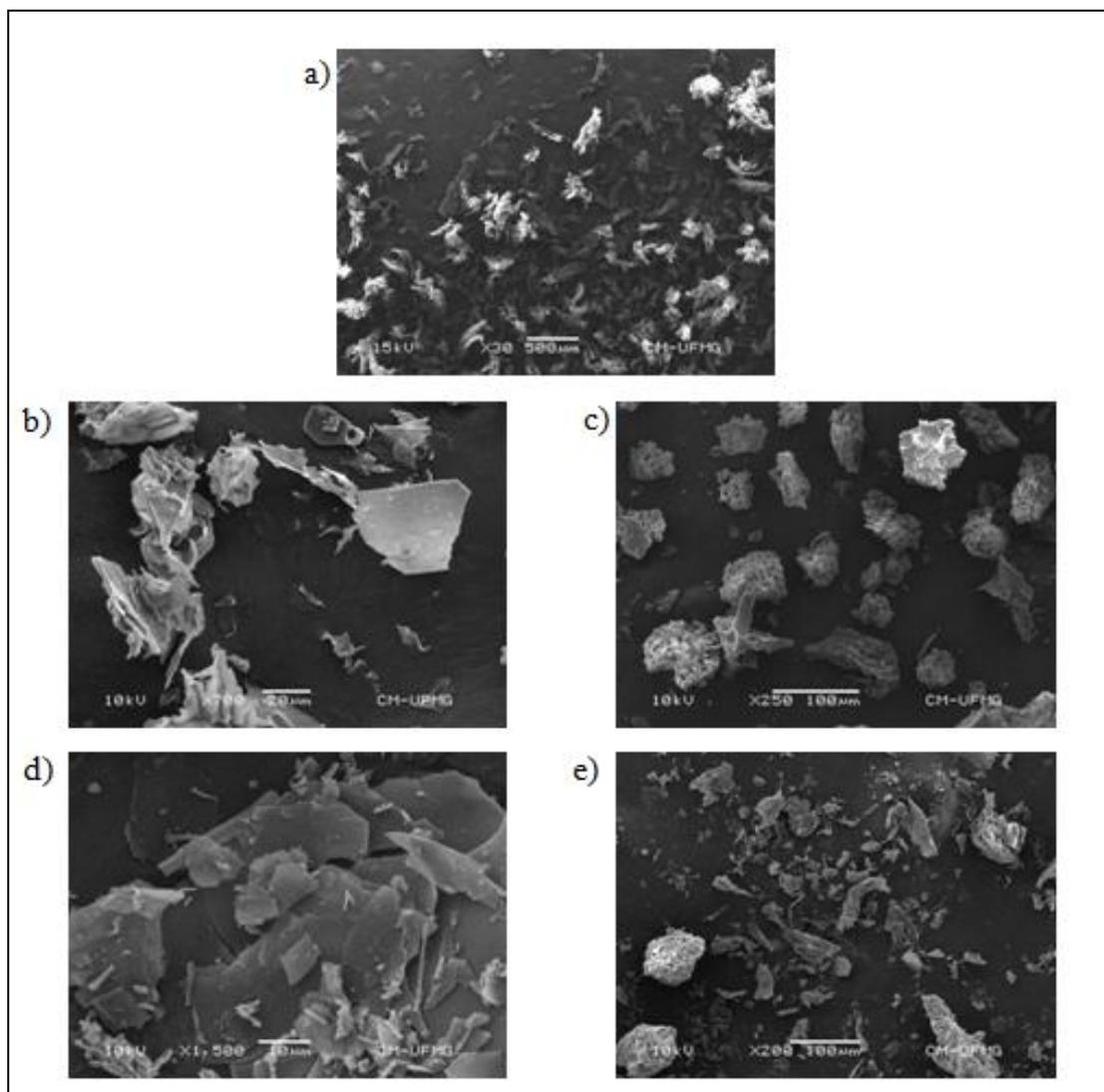
No espectro vibracional da mistura mecânica denominada MM( $\beta$ CDPNT), observa-se uma soma das bandas de absorção na região do infravermelho características dos compostos individuais, sugerindo que não ocorre interação entre as duas espécies.

### 3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura, permite a análise com grandes aumentos de superfícies irregulares, como superfícies de fratura. O conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos.

O exame morfológico das partículas dos produtos envolvendo  $\beta$ CD e PNT, obtidos por liofilização, foi realizado através de microscopia eletrônica de varredura em microscópio eletrônico JSM 5800. As amostras foram distribuídas sobre suportes de metal e revestidas com filme de ouro.

A Figura 16 exibe as imagens obtidas para o fármaco PNT livre e para os compostos ( $\beta$ CDPNT)1:1, ( $\beta$ CDPNT)2:1, ( $\beta$ CDPNT)3:1 e ( $\beta$ CDPNT)4:1. A PNT exibe característica amorfa como pode ser visualizado na Figura 16a. Os compostos ( $\beta$ CDPNT)1:1, 2:1, 3:1 e 4:1 exibem aspecto de lâmina, como é característico em amostras liofilizadas. No composto ( $\beta$ CDPNT)2:1 foram observadas a formação de alguns aglomerados como pode ser visualizado na Figura 16c.



**Figura 16:** Microscopia Eletrônica de Varredura para: a) PNT, b) ( $\beta$ CDPNT)1:1, c) ( $\beta$ CDPNT)2:1, d) ( $\beta$ CDPNT)3:1 e e) ( $\beta$ CDPNT)4:1.

### 3.4. TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA

A Titulação Calorimétrica Isotérmica, denominada ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) é uma poderosa técnica para estudar o processo de complexação em sistemas supramoleculares envolvendo ciclodextrinas, e por este motivo, para que tanto a parte experimental como o tratamento dos dados sejam compreendidos, seus principais fundamentos serão detalhados a seguir.

Diferentemente de qualquer outro método utilizado para determinar os parâmetros termodinâmicos, a calorimetria, como o nome sugere, usa a medida direta do calor de interação para investigar a extensão da ligação entre as moléculas. Os

instrumentos que fazem esse tipo de medida são denominados calorímetros, os quais medem o calor envolvido numa mudança de estado de um sistema.

Os conceitos relacionados ao calor se tornaram mais precisos através das experiências realizadas pelo matemático, físico e astrônomo francês Pierre-Simon, Marquês de Laplace e pelo químico francês Antoine-Laurent Lavoisier, quando em 1781, ambos construíram um calorímetro de gelo. (Chagas, 1992) Esse instrumento foi construído para medir o calor metabólico produzido por uma cobaia confinada por várias horas no calorímetro, onde a quantidade de calor liberada era medida pela quantidade de água proveniente do gelo derretido e pela quantidade de oxigênio consumido ou CO<sub>2</sub> produzido pelo animal, de acordo com a equação para o metabolismo aeróbio. (Chagas, 1992; Gaisford e O'neill, 2007; Freyer e Lewis, 2008)

Neste contexto, pode-se inferir que os calorímetros sempre tiveram associados com medidas biológicas. (Freyer e Lewis, 2008) Mas embora tenham sido utilizados pelos químicos desde o século XVIII, foi apenas nas últimas quatro décadas que ocorreram os principais avanços nesses equipamentos em eletrônica, design de materiais e a utilização de sensores de temperatura mais eficientes, tornando os calorímetros sensíveis o suficiente para permitir o estudo significativo de moléculas biológicas e suas interações. (Wiseman, Williston *et al.*, 1989; Gaisford e O'neill, 2007; Freyer e Lewis, 2008)

Nos últimos anos a literatura tem documentado um grande volume de dados estruturais de moléculas biológicas e seus complexos. Estes estudos envolvem dados de RMN e de difração de raios X de monocristal, as quais através da elucidação estrutural têm sido cruciais para a nossa melhor compreensão dos processos celulares. (Orengo, Bray *et al.*, 2002) Em geral, os diversos processos biológicos são mediados através de interações não covalentes entre as moléculas. No entanto, a informação estrutural não diz nada sobre a energia que conduzem a formação de complexos ou são responsáveis por manter as conformações dobradas de macromoléculas biológicas em solução. Detalhes estruturais também não explicam o mecanismo de formação do complexo biomolecular. Por conseguinte, a fim de obter uma compreensão mais completa dos sistemas é necessário combinar dados estruturais com uma compreensão termodinâmica do processo. (Ladbury e Doyle, 2004)

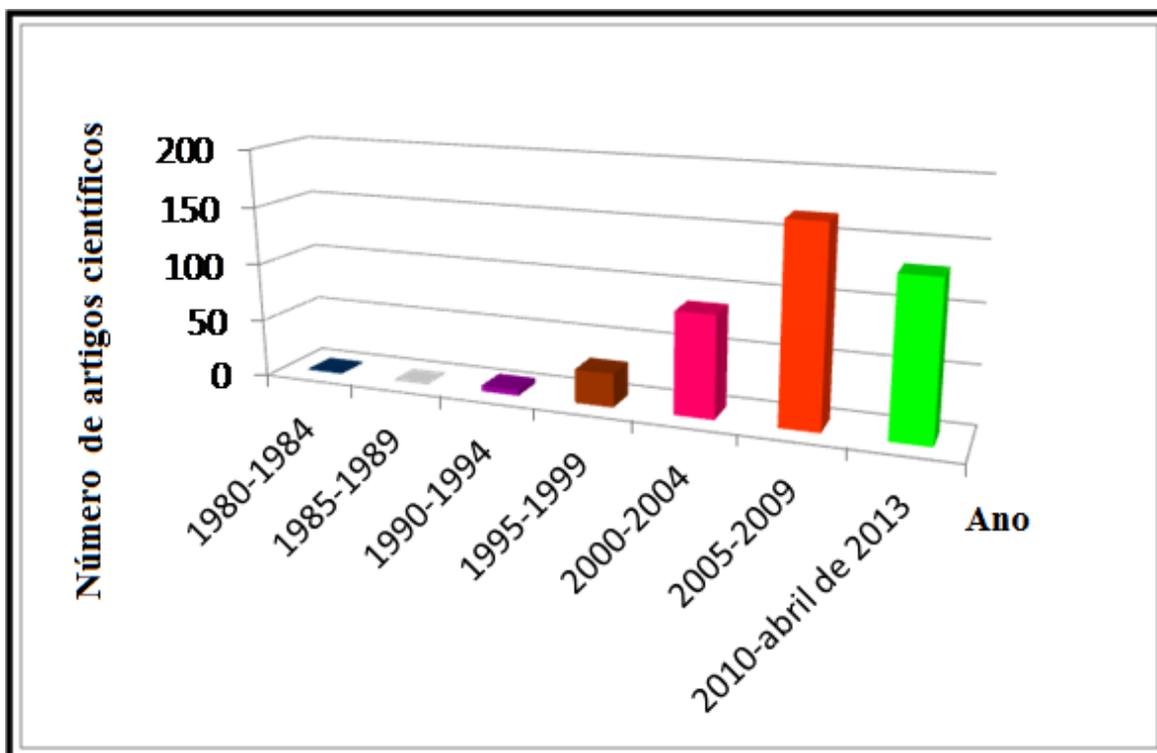
Neste enfoque, dois métodos calorimétricos se destacam em Biocalorimetria: a Calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a titulação calorimétrica isotérmica (ITC). Em especial, em um experimento de ITC, a diferença de temperatura entre a amostra e a

cela de referência é monitorada. Entretanto, em contraste com o DSC, ambas as celas, são mantidas a uma temperatura constante, e deste modo, são denominados de calorímetros isotérmicos. Neste caso, a reação é desencadeada por alteração da composição química da amostra através da titulação de um reagente na cela de amostra, e a variação do fluxo de calor pode ser medida. Em um experimento de ITC, a concentração total de reagente é, portanto a variável independente sob controle experimental. (Ladbury e Doyle, 2004) Devido ao fato de a maioria das reações químicas serem induzidas isotermicamente, a faixa de aplicações potenciais da ITC é ampla.

Essa técnica foi descrita pela primeira vez em 1965 por Christensen e colaboradores (Christen.Jj, Izatt *et al.*, 1965) como um método para determinação simultânea da constante de equilíbrio e da variação de entalpia. O método foi originalmente aplicado a diversos equilíbrios ácido-base e à reações de complexação de íons metálicos. (Christen.Jj, Izatt *et al.*, 1966) Tais sistemas puderam ser estudados com a instrumentação calorimétrica disponível na época, a qual foi limitada à determinação de constantes de equilíbrio,  $K_{eq}$ , cujos valores eram inferiores a  $10^5 M^{-1}$ . (Ladbury e Doyle, 2004) Em 1978, Beaudette e Langerman (Biltonen, Langerman *et al.*, 1979) publicaram um dos primeiros estudos calorimétricos de um sistema biológico, e foi apenas dez anos depois, em 1989, que o primeiro microcalorímetro foi disponibilizado comercialmente. Esse equipamento foi disponibilizado pela Microcal e projetado para o estudo de sistemas biológicos, sendo definido como um “dispositivo para determinação da constante de equilíbrio em minutos”. (Wiseman, Williston *et al.*, 1989)

Uma pesquisa realizada na web of science ([http://apps.webofknowledge.com/summary.do?SID=4FCINnJ4P1dIMadijGp&product=WOS&qid=24&search\\_mode=GeneralSearch](http://apps.webofknowledge.com/summary.do?SID=4FCINnJ4P1dIMadijGp&product=WOS&qid=24&search_mode=GeneralSearch) (acesso em 22/05/2013)) revela um total de 447 artigos envolvendo ou citando essa técnica até abril de 2013, como disposto no Gráfico 1. O primeiro artigo científico foi publicado em 1980, (Roth e Lennartz, 1980) o qual relata um estudo do calor de hidrogenação usando a técnica. O segundo artigo foi publicado apenas em 1990 e traz uma descrição desse método calorimétrico feita por Ernesto Freire, (Freire, Mayorga *et al.*, 1990) um dos especialistas nessa área. A pouco mais de uma década, o calorímetro de titulação isotérmica foi considerado como um equipamento de especialista, uma vez que poucos laboratórios tinham acesso a um e poucos entendiam as implicações de grande parte dos dados gerados.

**Gráfico 1:** Pesquisa realizada na Web of Science sobre o número de artigos publicados envolvendo ITC, até maio de 2013 (palavra-chave: Isothermal Titration Calorimetry).



Através do Gráfico 1, é possível observar que o desenvolvimento de pesquisas utilizando ITC foi pequeno mesmo após a disponibilização de calorímetros comerciais, em 1989, o que se deve a baixa sensibilidade dos equipamentos. E foi somente a partir da última década que o número de trabalhos publicados passaram a ser mais expressivos.

Atualmente, a utilização dessa técnica tem se difundido muito, o que se deve a diversidade de aplicações, auxiliando na compreensão de muitos sistemas. O crescente uso desta pode ser atribuído principalmente a três fatores: o desenvolvimento de calorímetros de alta sensibilidade, o fato de que os processos químicos e físicos ocorrem por absorção ou liberação de calor e ainda pela capacidade de propiciar a medida da entalpia de interação ( $\Delta H^0$ ) do sistema. (Wiseman, Williston *et al.*, 1989; Freire, Mayorga *et al.*, 1990) Além disso, através dessa técnica é possível se ter uma descrição termodinâmica completa do sistema.

Experimentalmente, a medida obtida pelo ITC se baseia na medida do calor envolvido no processo de interação entre duas espécies químicas colocadas em contato

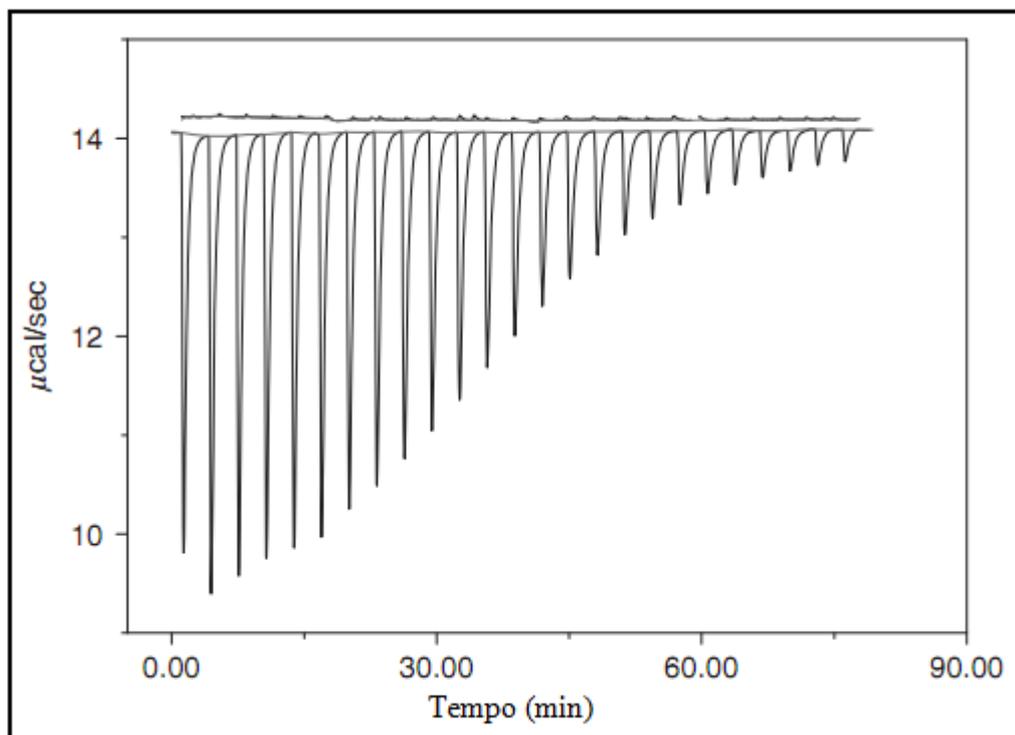
de modo gradual e contínuo em uma cela calorimétrica mantida em uma temperatura definida. A adição de uma espécie química contida em uma seringa, chamado titulante, na espécie contida na cela calorimétrica, denominada titulado, possibilita a medida de energia envolvida na interação química entre as mesmas.

Um equipamento moderno de ITC é composto por uma cela de amostra e outra de referência, sendo que ambas podem apresentar volumes tão pequenos quanto 0,3 mL. A cela de referência contém apenas água ou tampão e a cela de amostra contém a macromolécula ou ligante solubilizada no mesmo solvente ou tampão contido na cela de referência, ambas localizadas em um revestimento adiabático. O titulado fica contido na cela de medida, enquanto que o titulante é injetado automaticamente nesta cela por uma micro seringa, a qual gira em torno do seu próprio eixo, injeta e subseqüentemente homogeneiza os reagentes na cela da amostra. Cada volume de injeção da seringa pode variar entre 1 a 30  $\mu\text{L}$ . (Ladbury e Doyle, 2004)

A maior parte dos calorímetros de titulação isotérmica é baseada na metodologia de compensação de energia. Durante um experimento, um circuito de autocompensação mantém nula a diferença de temperatura entre a cela da referência e a cela da amostra. A cela de referência é sempre mantida sob um pequeno aquecimento constante, o que mantém também a temperatura constante, enquanto que, na célula de medida, o fluxo de aquecimento é ajustado a cada injeção para corrigir a diferença de temperatura entre as duas células. As vantagens deste sistema incluem um tempo de resposta rápido, elevada sensibilidade e a necessidade de relativamente pouca quantidade de amostra. (Ladbury e Doyle, 2004; Freyer e Lewis, 2008)

O calor liberado ou absorvido pela interação é proporcional à quantidade de reagente injetado, o qual é detectado empregando-se um sistema de resposta eletrônico, que mantém as células de medida e referência sempre a uma mesma temperatura. (Gaisford e O'Neill, 2007) A quantidade de energia que tem de ser aplicada para compensar o calor produzido na cela de amostra, após uma injeção de ligante, é medida diretamente; ou seja; a potência térmica aplicada que é necessária para retornar o calorímetro ao seu estado estável, seguindo uma injeção, é diretamente proporcional ao calor da reação.

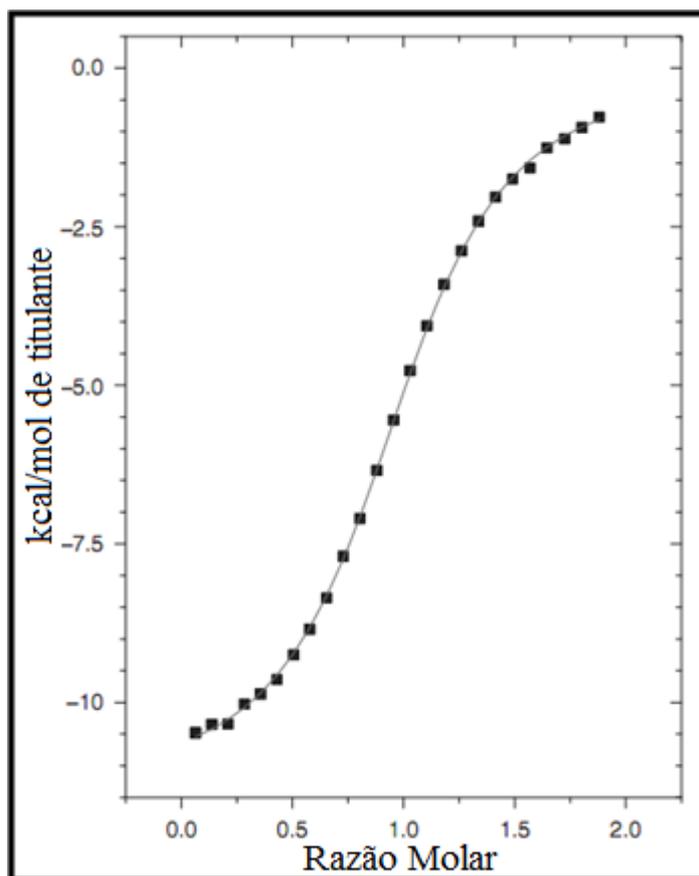
A Figura 17 mostra os dados finais obtidos a partir do experimento de ITC para uma titulação hipotética, ligante-proteína. O gráfico esboça a variação do fluxo de calor em função do tempo para um processo exotérmico. (Freyer e Lewis, 2008)



**Figura 17:** Dados finais de ITC para processo exotérmico

O registro de um valor constante de energia indica que o sistema atingiu o equilíbrio. Neste caso, a energia registrada pela linha base é proporcional à energia necessária para manter a diferença de temperatura entre a cela de referência e o isolamento adiabático. Inicialmente é realizada uma correção dos dados, removendo dos dados brutos, os efeitos adicionais de calor, o que é feito diretamente no software do equipamento. (Ladbury e Doyle, 2004; Freyer e Lewis, 2008)

A Figura 18, ilustra os dados após a correção do calor de diluição e a integração dos picos em relação ao tempo. A fim de analisar os dados de ITC com base em parâmetros termodinâmicos relevantes, um modelo de ligação deve ser assumido. O fabricante do equipamento fornece um software com diversos modelos.



**Figura 18:** Dados de ITC após a correção dos dados e integração.

Um procedimento de regressão não linear é utilizado para ajustar os dados experimentais a um modelo, ou seja, uma descrição matemática do processo que ocorre no calorímetro. A regressão não linear é usada junto com as equações do modelo para determinar os melhores valores dos parâmetros de ajuste (por exemplo,  $K$ ,  $\Delta H$ , e  $n$ ). (Pierce, Raman *et al.*, 1999; Gaisford e O’neill, 2007)

A partir da regressão não linear, um ajuste ou curva teórica é gerado e então comparado com a curva de dados reais. Uma função erro é calculada e se esta não pode ser minimizada para um valor aceitável, então um outro modelo deve ser testado. (Ladbury e Doyle, 2004; Gaisford e O’neill, 2007) Em geral, as curvas de ITC apresentam perfil próximo de uma sigmoide e o modelo matemático mais comum, utilizado para fazer o ajuste não linear dos pontos desse tipo de curva calorimétrica e determinar os parâmetros termodinâmicos da interação, é denominado de Isoterma de Wiseman. (Freyer e Lewis, 2008)

A equação 1, expressa a regressão não linear da Isoterma de Wiseman, a qual relaciona a variação do fluxo de calor pela concentração de titulante adicionado por

injeção, à pressão constante, com a razão absoluta da concentração de titulante pela concentração de titulado, a qualquer ponto durante o curso da titulação. Os parâmetros  $\Delta H^\circ$  e  $V_o$  correspondem, respectivamente, à entalpia molar padrão de complexação e o volume efetivo da solução na cela de titulação. O parâmetro  $r$  é uma variável de composição que corresponde ao inverso da concentração de titulado multiplicado pela constante de equilíbrio do sistema,  $X$  equivale a titulante e  $X_R$  corresponde à razão entre a concentração de titulante pela concentração de titulado.

$$\left(\frac{dQ}{d[X]_{\text{tot}}}\right)_P = \Delta H^\circ V_o \left[ \frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R - r^2) - 4X_R}} \right] \quad \text{Equação 1}$$

Através do ajuste é possível determinar simultaneamente a variação de entalpia, a estequiometria e a constante de equilíbrio do sistema.  $\Delta H^\circ$  será equivalente à quantidade de calor recebida ou fornecida pelo sistema, logo a variação de entalpia é diretamente proporcional ao fluxo de calor. O ponto de inflexão da curva é numericamente igual ao coeficiente estequiométrico do sistema, denominado  $n$ , e a constante de equilíbrio ( $K_{\text{eq}}$ ) do sistema pode ser obtida pelo coeficiente angular da tangente ao ponto de inflexão.

Algumas relações termodinâmicas fundamentais que descrevem o fenômeno das interações moleculares devem ser consideradas. Com o valor de  $K_{\text{eq}}$  obtido pelo ajuste dos pontos à Isoterma de Wiseman, é possível calcular a variação da energia-livre de Gibbs padrão do processo, a uma dada temperatura, por meio da relação termodinâmica descrita na Equação 2, onde  $T$  é a temperatura absoluta em Kelvin e  $R$  é a constante dos gases.

$$\Delta G^\circ = -R T \ln K \quad \text{Equação 2}$$

Com o valor de  $\Delta H^\circ$  da interação, obtido pelo tratamento descrito acima, e conhecendo-se  $\Delta G^\circ$  e a temperatura na qual o experimento foi executado, o termo entrópico pode ser calculado pelo uso da Equação 3.

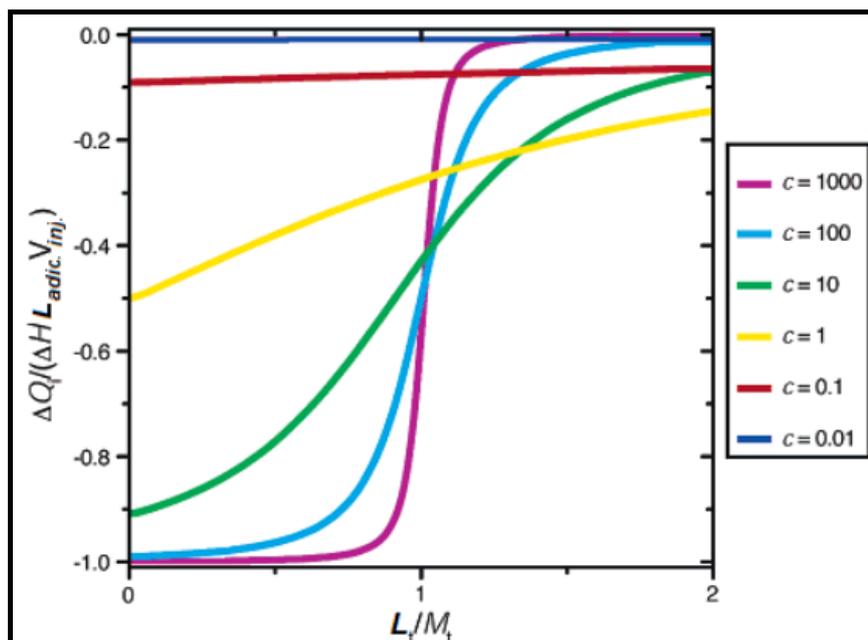
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Equação 3}$$

Um termo adicional que pode ser determinada a partir do experimento de ITC é a variação da capacidade calorífica a pressão constante. Com isso, a titulação calorimétrica isotérmica permite uma descrição termodinâmica completa do sistema.

As concentrações dos reagentes (titulante e titulado) devem estar em uma razão adequada para tornar possível a obtenção de um valor confiável da constante de equilíbrio de associação ( $K_a$ ) das espécies químicas estudadas em um experimento de titulação. Neste aspecto, Wiseman e colaboradores notaram que o perfil da curva de titulação calorimétrica variava conforme o valor da multiplicação de  $K_a$  pela concentração de sítios de interação do titulado,  $M$ , nos casos onde o titulado apresentava um único sítio de interação de acordo com a equação 4. O produto desta multiplicação foi denominado fator  $c$ . (Wiseman, Williston *et al.*, 1989; Turnbull e Daranas, 2003)

$$c = K_a [M]_{\text{tot}} \quad \text{Equação 4}$$

O fator  $c$  foi definido por Wiseman para avaliar a confiabilidade da determinação de  $K_a$  pela regressão não-linear da isoterma de interação, obtida em um experimento de titulação calorimétrica. Na Figura 19 estão expostas curvas de titulação calorimétrica simuladas para diferentes valores de  $c$ . O calor liberado é apresentado em função da razão molar entre o titulante e o titulado. O cálculo do fator  $c$  auxilia a seleção das melhores condições iniciais de um experimento de titulação isotérmica, uma vez que, valores de  $c$  entre 10 e 500 resultam em curvas cujo ajuste fornecerá valores confiáveis para a constante de equilíbrio. (Turnbull e Daranas, 2003; Ladbury e Doyle, 2004)



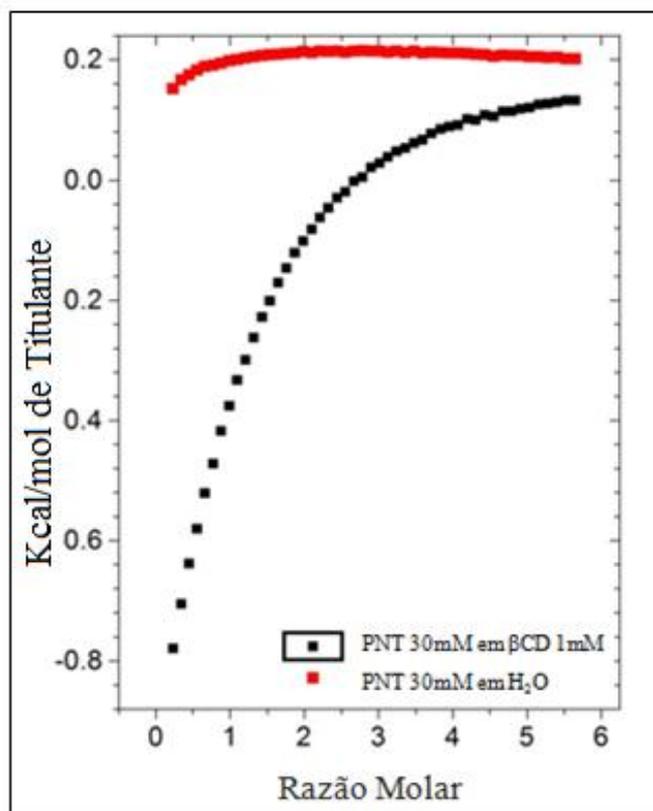
**Figura 19:** Curvas de ITC simuladas para uma interação química para diferentes valores de  $c$ .

Usando o perfil energético muitas vezes é possível determinar a fonte da interação do sistema. A discriminação termodinâmica permite-nos diferenciar entre sistemas e, por vezes, obter uma visão geral das forças dominantes responsáveis pelas ligações. (Lafont, Armstrong *et al.*, 2007; Freire, 2008)

Em suma, a titulação calorimétrica isotérmica tem contribuído para elucidação das características energéticas da formação de complexos moleculares, relacionados às mais diversas áreas do conhecimento, uma vez que, em geral, com um único experimento é possível determinar o perfil termodinâmico do sistema em estudo e correlacionar tais parâmetros físico-químicos com dados estruturais oriundos de outras caracterizações. (Bouchemal, Couvreur *et al.*, 2009; Li, Gao *et al.*, 2010)

Com base nestas informações, a supracitada técnica físico-química foi utilizada para avaliar os parâmetros termodinâmicos da interação supramolecular entre PNT e  $\beta$ CD. A Figura 20 mostra a titulação PNT (30mM) em água (experimento controle) através da curva em vermelho e em solução aquosa de  $\beta$ CD (1mM), curva de preto. O calor de diluição determinado no experimento controle foi subtraído do calor de reação medido através da titulação de PNT em uma solução aquosa de  $\beta$ CD, para alcançar o calor de reação, Figura 21. Além disso, a titulação do PNT em solução aquosa  $\beta$ CD foi realizada em triplicata e a curva de titulação média demonstrou a reprodutibilidade experimento, confirmando os parâmetros termodinâmicos obtidos.

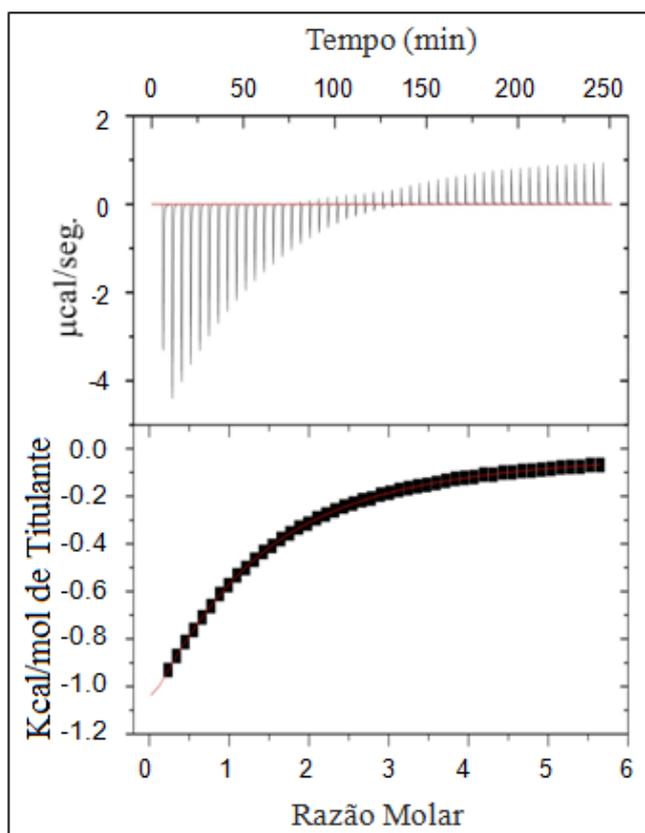
O experimento de diluição em água PNT demonstra um perfil ligeiramente endotérmico (Figura 20), que pode ser correlacionado com a possível agregação das moléculas de PNT na célula de reação. A curva de titulação da PNT em  $\beta$ CD fornece valores de calor de reação negativos, indicando um processo exotérmico, como observado na Figura 21. Este perfil exotérmico pode ser atribuído às interações hóspede/hospedeiro, conforme descrito para sistema similares. (Denadai, Teixeira *et al.*, 2007; De Sousa, Denadai, Lula, Nascimento *et al.*, 2008)



**Figura 20:** Titulação calorimétrica isotérmica para o composto  $(\beta\text{CDPNT})1:1$ : curva de titulação da PNT:  $\blacksquare$  em  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\blacksquare$  em  $\beta\text{CD}$  e b) (-) curva de titulação final,  $\blacksquare$  curva após a subtração dos dados de diluição da PNT em  $\text{H}_2\text{O}$  e (- - -) regressão não linear.

Esta curva foi analisada com base na isoterma Wiseman, (Turnbull e Daranas, 2003) fornecendo o coeficiente estequiométrico equivalente ( $n$ ) a  $0,84 \pm 0,01$ ,  $K$  a constante de equilíbrio =  $758 \pm 7$  e a contribuição entalpia  $\Delta H^\circ = -11,2 \pm 0,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Além disso, o processo de formação do composto de inclusão envolvendo PNT e  $\beta\text{CD}$  foi espontânea como evidenciado pela energia livre de Gibbs padrão  $\Delta G^\circ$  ( $-16,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), obtida a partir da equação 2. Da Equação 3, descrita anteriormente, é calculada uma contribuição entrópica positiva ( $T\Delta S^\circ = 5,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).



**Figura 21:** Dados de ITC para o composto ( $\beta$ CDPNT)1:1: (-) curva de titulação final, ■ curva após a subtração dos dados de diluição da PNT em  $H_2O$  e (---) regressão não linear.

Os parâmetros termodinâmicos da complexação refletem a natureza das interações não covalentes que ocorrem entre o hóspede e as moléculas do fármaco. A formação dos compostos de inclusão é principalmente um resultado de contribuições entálpicas e entrópicas entre a molécula hóspede e a convidada na cavidade relativamente hidrofóbica.

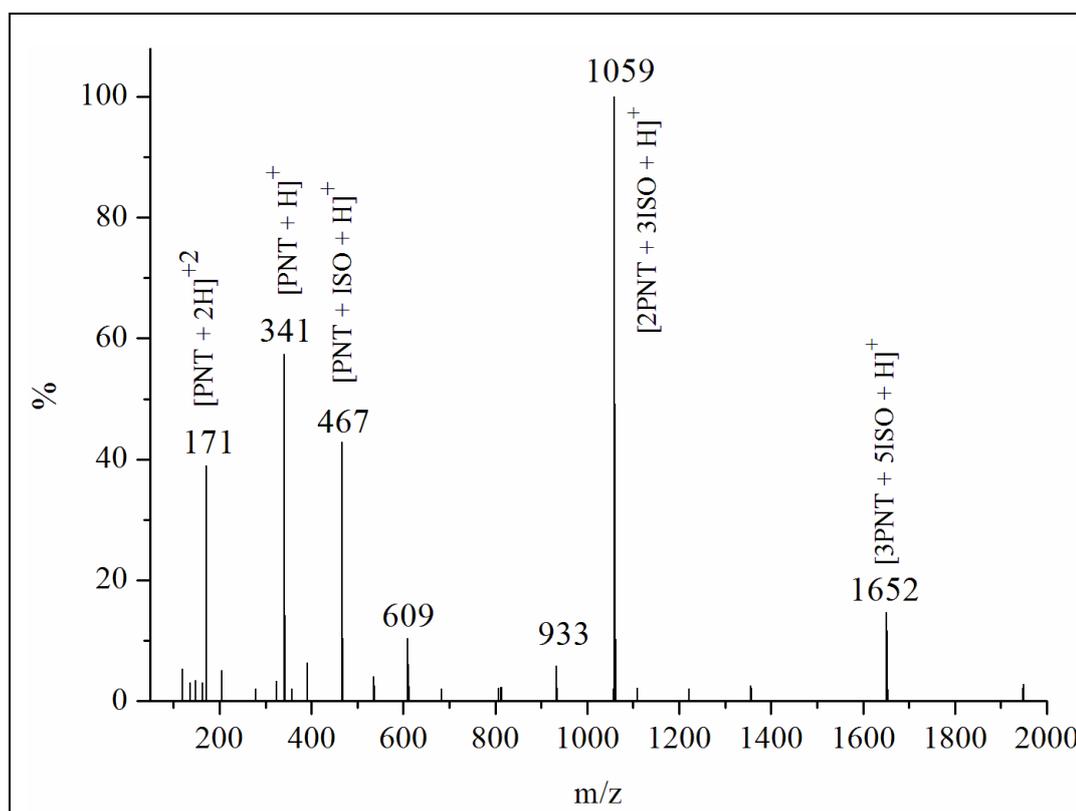
A variação de entalpia pode ser associada com a saída das moléculas de água da cavidade de  $\beta$ CD para acomodar a molécula de PNT e com a formação de interações supramoleculares de cooperação entre o fármaco e a molécula hospedeira. A dessolvatação da  $\beta$ CD e PNT durante a complexação pode ser uma importante contribuição para a componente entrópica positiva, através do ganho de entropia rotacional e de translação das moléculas de água liberadas, quando comparado com substâncias puras. O valor de  $N$  sugere equilíbrio entre os diferentes sistemas supramoleculares em solução e está de acordo com outros resultados anteriormente reportados. (Denadai, Teixeira *et al.*, 2007; De Sousa, Denadai, Lula, Nascimento *et al.*,

2008)

### 3.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY

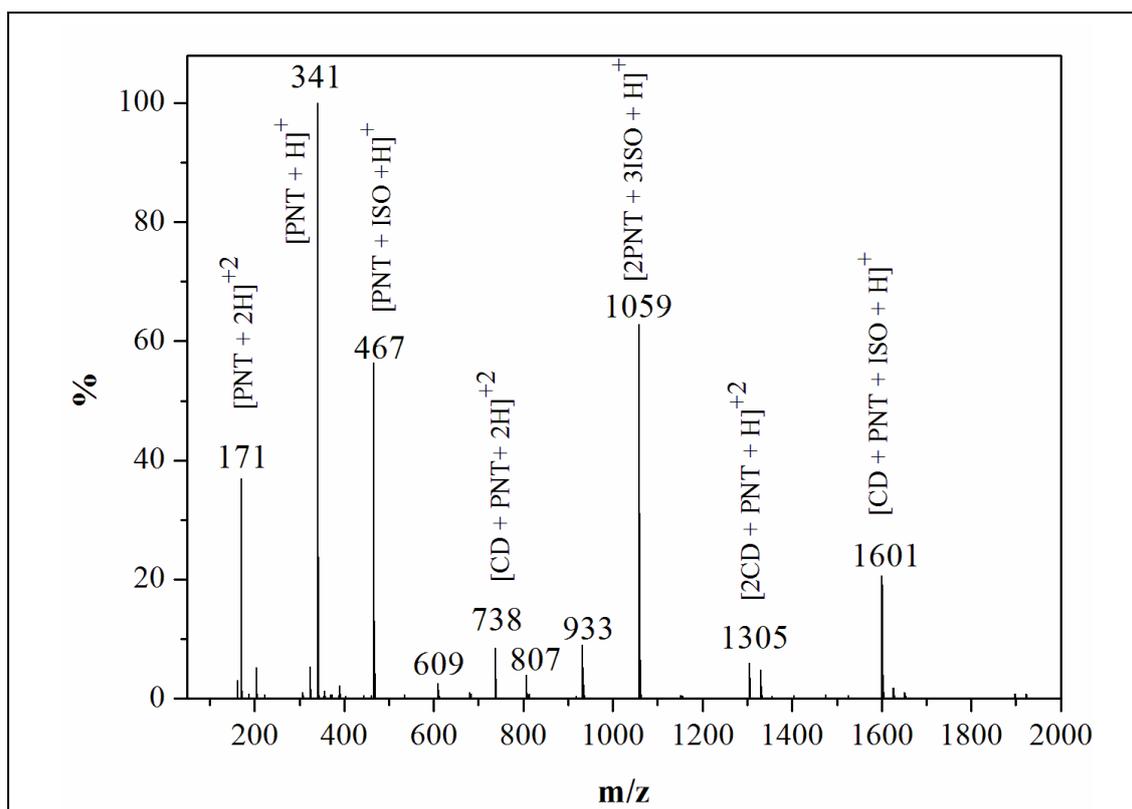
A técnica Espectrometria de massa com ionização por “eletrospray” (IES-EM) foi empregada para o estudo em solução, do sistema formado entre PNT e  $\beta$ CD .

A técnica no modo positivo (IES (+)-EM) foi usada para obter informações sobre a distribuição das espécies supramoleculares em soluções aquosas nas seguinte proporções: 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1 de  $\beta$ CD:PNT, Figuras 23, 24, 25 e 26, respectivamente. O espectro IES (+)-EM da PNT livre é apresentado na Figura 22.

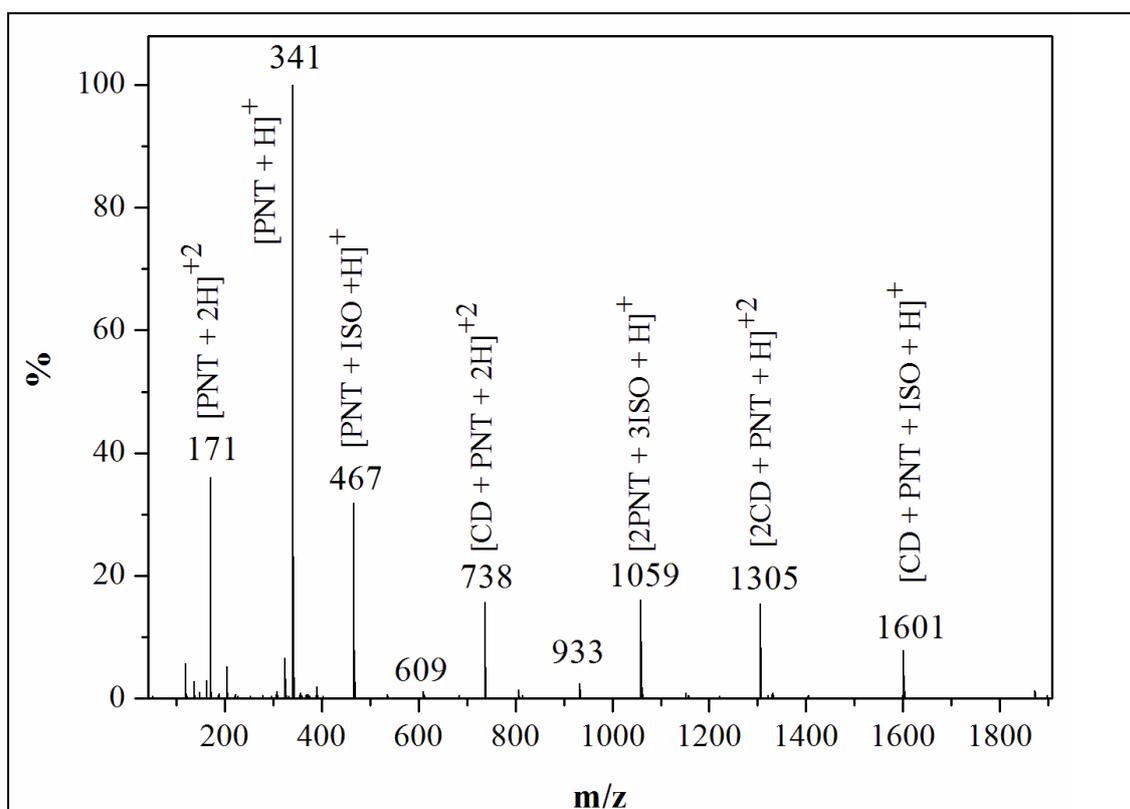


**Figura 22:** Espectro (IES (+)-EM) obtido para PNT.

No espectro de massa do fármaco PNT, o íon molecular de m/z 341 foi atribuído à forma protonada da PNT, ou seja,  $[PNT + H]^+$ , enquanto m/z 171 foi atribuído à espécie duplamente protonada  $[PNT + 2H]^{2+}$ . Além disso, os íons de m/z 467 e 1059 foram atribuídos como os íons protonados formados entre PNT e isotionato (ISO), ou seja,  $[PNT + ISO + H]^+$  e  $[2PNT + 3ISO + H]^+$ , respectivamente.

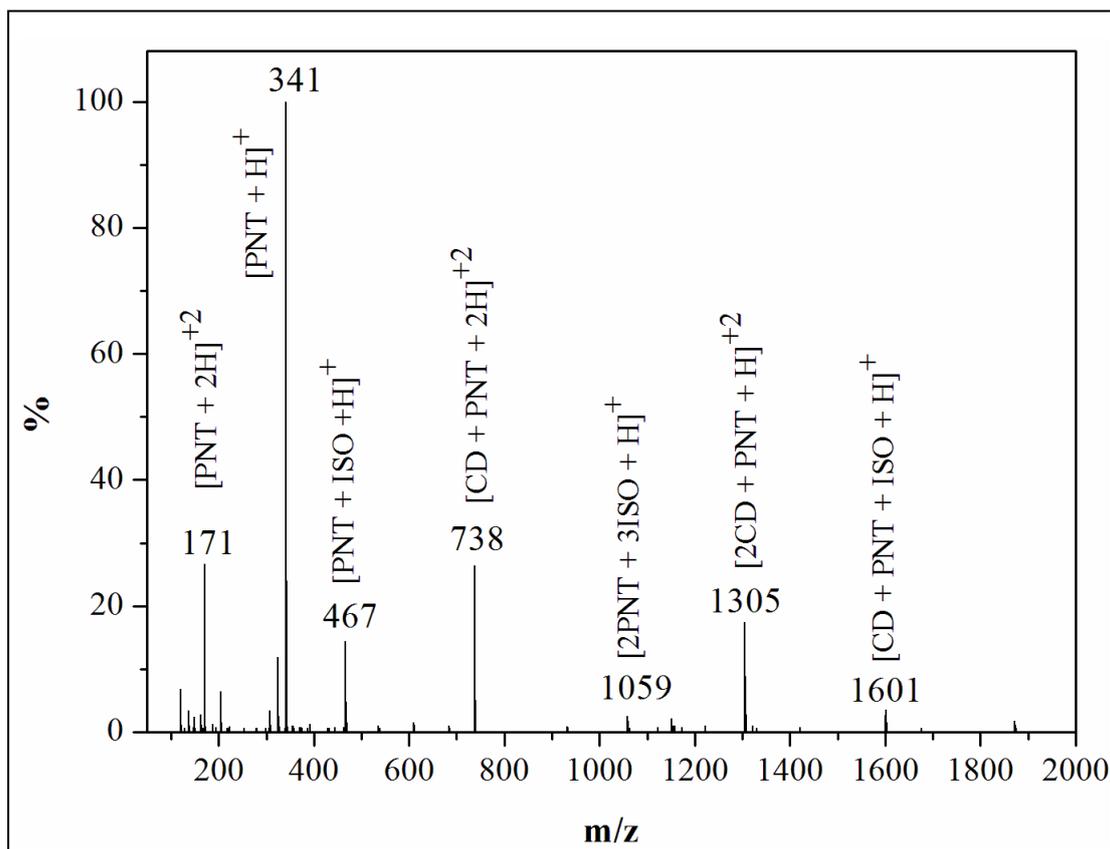


**Figura 23:** Espectro (IES (+)-EM) obtido para (βCD:PNT)1:1.



**Figura 24:** Espectro (IES (+)-EM) obtido para (βCD:PNT)2:1.

Esses íons foram também observados no espectro de IES-EM dos compostos expostos nas Figuras 23, 24, 25 e 26, confirmando que as moléculas livres PNT estão em equilíbrio com seu compostos de inclusão em solução aquosa. Adicionalmente, tais resultados indicam que a molécula livre PNT é capaz de formar agregados, corroborando com o observado pela curva de diluição da PNT no experimento de ITC.

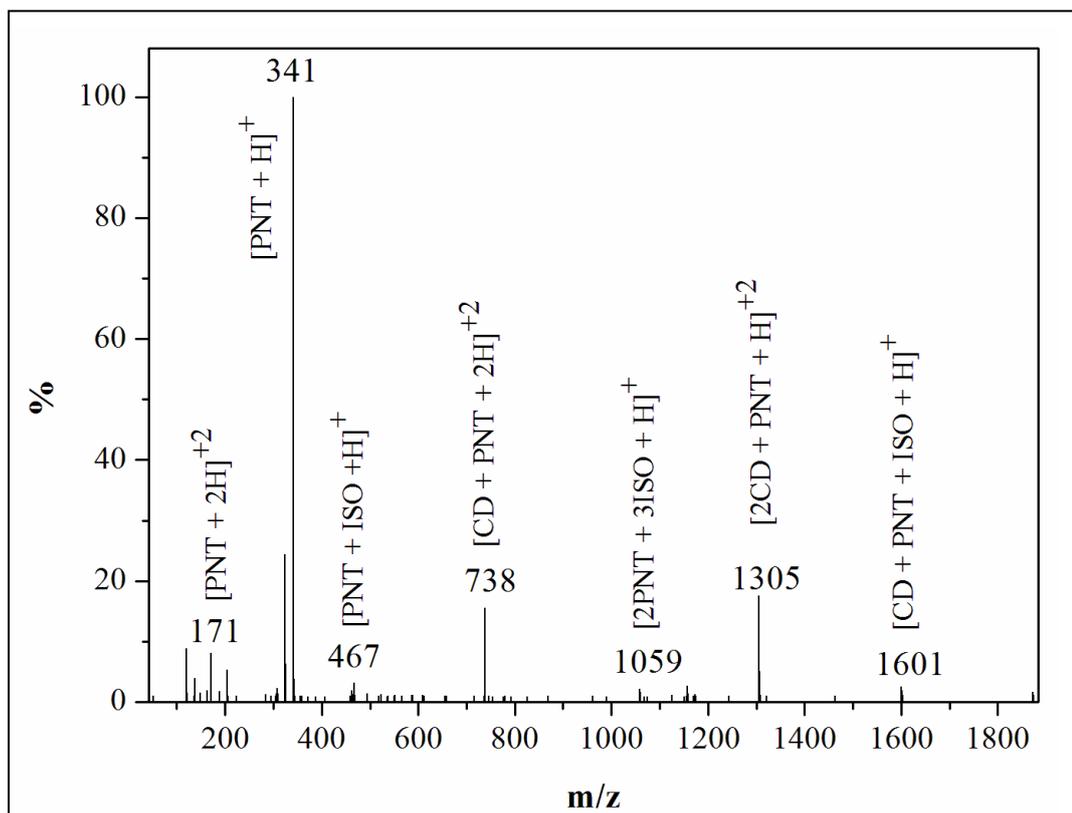


**Figura 25:** Espectro (IES (+)-EM) obtido para (βCD:PNT)3:1.

Além dos íons livres de PNT, íons referentes aos compostos de inclusão também foram observados no espectro de IES-EM da βCD:PNT no sistema 1:1, Figura 23. Em particular, os íons moleculares com razão massa/carga 1601, 738, e 1305 podem ser observados em todos os espectros de massa dos compostos de inclusão. Tais íons foram atribuídos às formas protonadas do compostos de inclusão e foram representados da seguinte forma:  $[\beta\text{CD} + \text{PNT} + \text{ISO} + \text{H}]^+$ ,  $[\beta\text{CD} + \text{PNT} + 2\text{H}]^{2+}$  e  $[2\beta\text{CD} + \text{PNT} + 2\text{H}]^{2+}$ , respectivamente. No composto obtido na proporção molar βCD:PNT (1:1), o contra-íon isotionato (ISO) foi deslocado da esfera de coordenação da molécula, quando a PNT interagiu com a βCD, provavelmente formando compostos de inclusão com sua cavidade.

Este fenômeno é enfatizado quando o complexo ( $\beta$ CD:PNT)2:1 foi formado em solução, em que o contra-íon ISO não foi observado na estrutura supramolecular. O complexo supramolecular ( $\beta$ CD:PNT)1:1 detectado neste experimento foi  $[\beta$ CD + PNT + ISO + H] $^+$  e  $[\beta$ CD + PNT + 2H] $^{2+}$ , em que a  $\beta$ CD também deslocou o contra-íon.

A Figura 24 exibe o espectro de IES-EM do composto obtido na razão molar ( $\beta$ CD:PNT)2:1. Pode-se observar que a intensidade relativa do íon com m/z 1305 referente ao ( $[2\beta$ CD + PNT + 2H] $^{2+}$ ) é maior do que a observada na Figura 23. Este resultado indica que uma maior concentração relativa de  $\beta$ CD induz a formação de maiores quantidades do sistema supramolecular ( $\beta$ CD:PNT)2:1, em solução. Além disso, a quantidade relativa de  $[\beta$ CD + PNT + ISO + H] $^+$  é menor do que a observada na Figura 23.



**Figura 26:** Espectro (IES (+)-EM) obtido para ( $\beta$ CD:PNT)4:1.

Esta tendência é confirmada pelos resultados de IES-EM para os sistemas 3:1 e 4:1, ( $\beta$ CD:PNT), Figuras 25 e 26, respectivamente. Como esperado, ao aumentar a concentração de  $\beta$ CD, acima da razão molar 2:1, não foram obtidas superestruturas envolvendo  $\beta$ CD e PNT, referentes aos sistemas 3:1, 4:1 ou superior. Este resultado

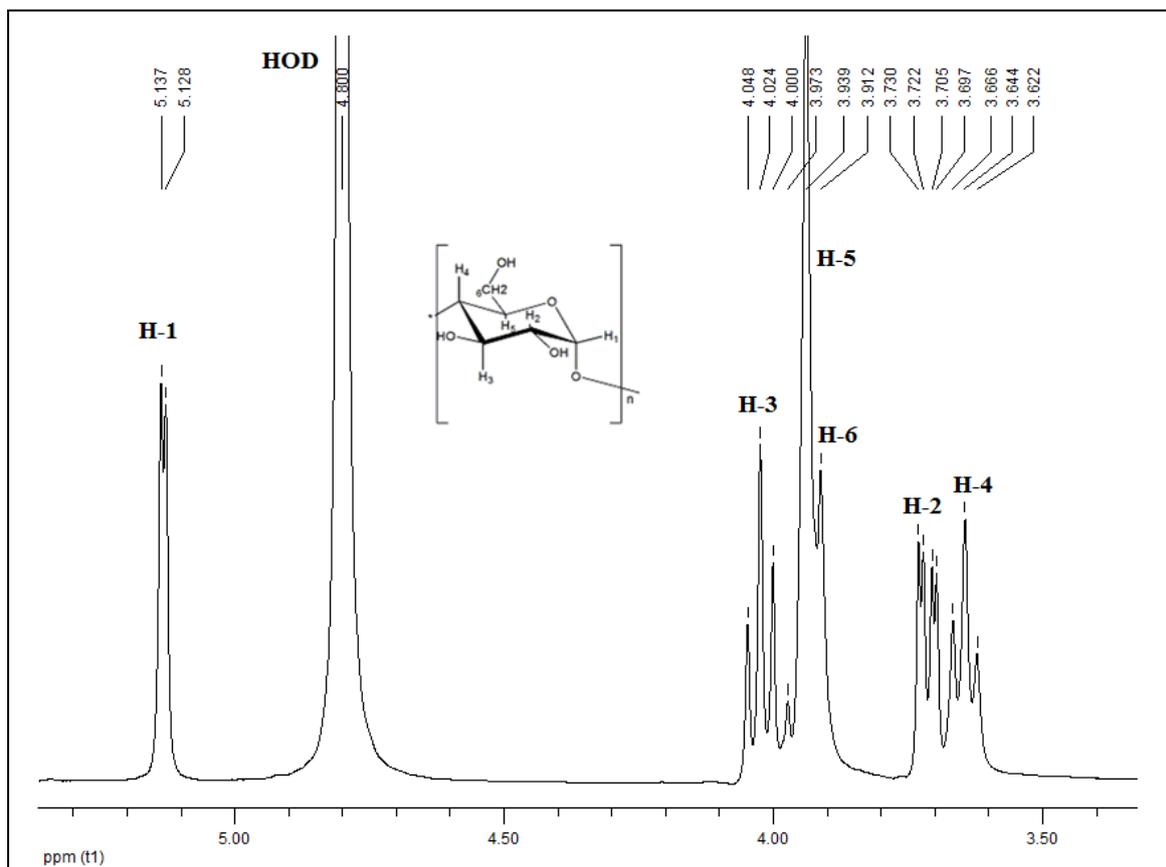
sugere que as espécies supramoleculares mais prováveis em equilíbrio em solução aquosa são: molécula PNT livre e seus compostos de inclusão com  $\beta$ CD nas razões molares 1:1 e 2:1. Tais dados estão de acordo com os resultados obtidos através do experimento de titulação calorimétrica isotérmica. Adicionalmente, quando a concentração de  $\beta$ CD é maior, a partir de 1:1 a 4:1 molar, a quantidade relativa de moléculas PNT livre, tais como  $[\text{PNT} + \text{ISO} + \text{H}]^+$  e  $[2\text{PNT} + 3\text{ISO} + \text{H}]^+$  reduzem em solução, sugerindo que os complexos supramolecular ( $\beta$ CD:PNT, 1:1 e 2:1) são formadas sob as condições experimentais.

### 3.6. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

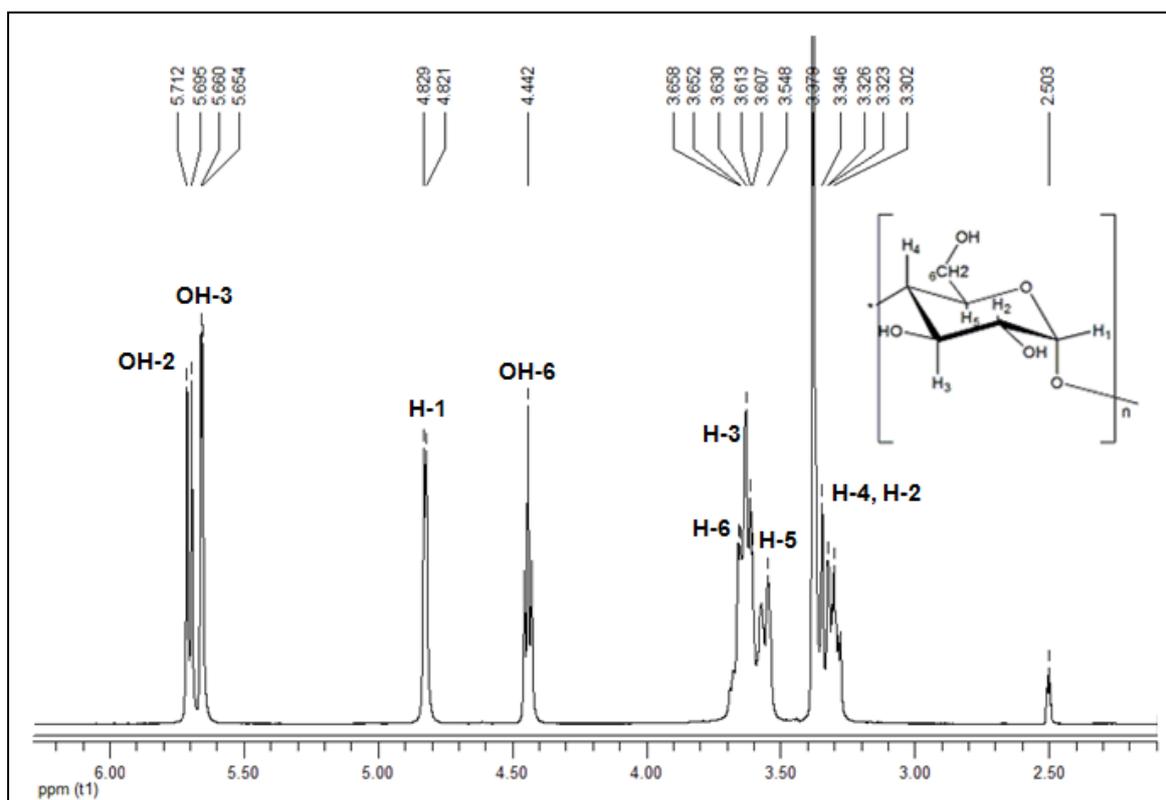
O uso da ressonância magnética nuclear tem contribuído significativamente no estudo de ciclodextrinas e seus compostos de inclusão, fornecendo informações sobre as interações e modos de ligação nas associações e complexações, além das disposições espaciais de grupos funcionais das moléculas.(Schneider, Hacket *et al.*, 1998)

O fenômeno de complexação altera a distribuição de densidade de carga sobre os grupos funcionais envolvidos e, conseqüentemente, altera o momento magnético nuclear resultante sobre esses grupos, levando a variações de deslocamento químico nos espectros dos compostos de inclusão em relação às moléculas livres. Entretanto, os efeitos de deslocamentos químicos, após a inclusão na cavidade da ciclodextrinas, são limitados a poucos décimos de ppm, visto que nos complexos formados ocorrem apenas interações intermoleculares fracas do tipo de interações dipolares, que não alteram consideravelmente a polaridade dos complexos finais.

Os espectros de RMN de hidrogênio em  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{DMSO-}d_6$  da  $\beta$ CD estão expostos nas Figuras 27 e 28, respectivamente, com o objetivo de servir como parâmetro para quaisquer modificações nos valores de deslocamentos químicos que possam ocorrer em função da interação hóspede e hospedeiro. As atribuições das ressonâncias da  $\beta$ CD foram equivalentes as anteriormente apresentadas na literatura.(Schneider, Hacket *et al.*, 1998)

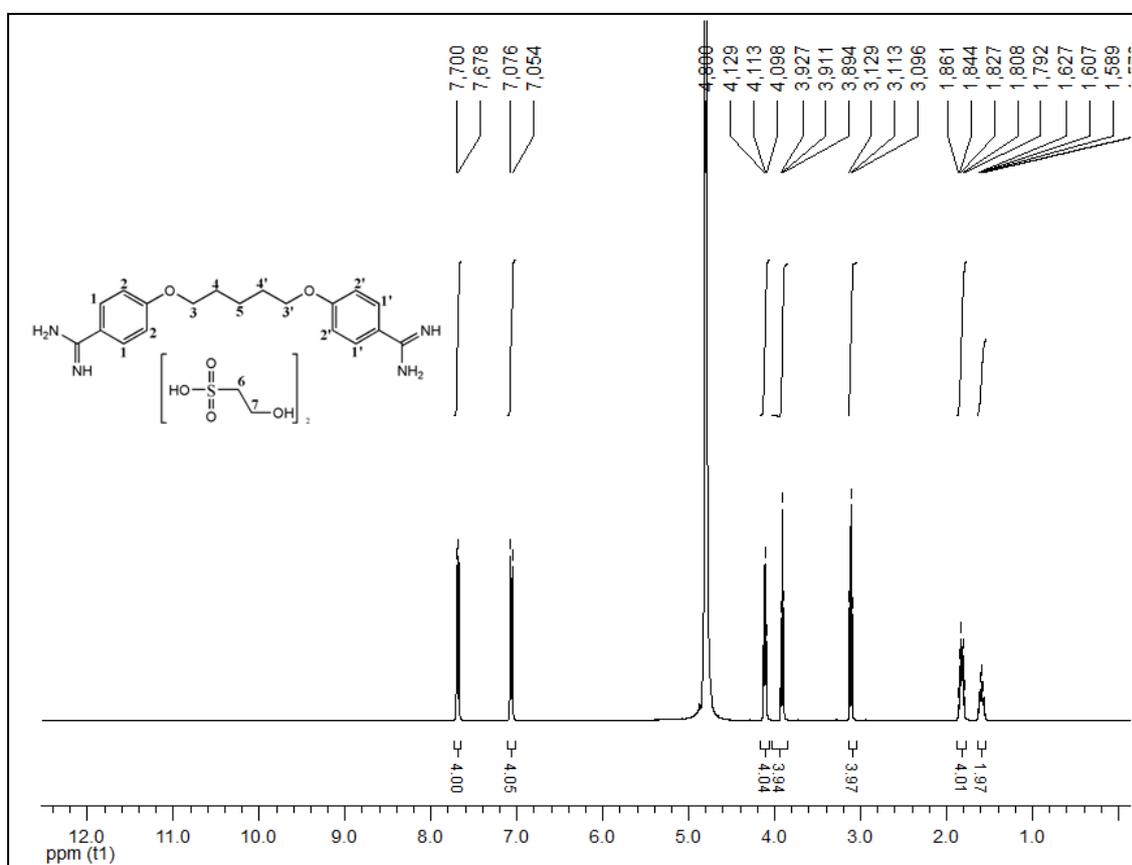


**Figura 27:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a  $\beta$ CD em  $\text{D}_2\text{O}$  ( $27^\circ\text{C}$ ,  $400\text{ MHz}$ ).

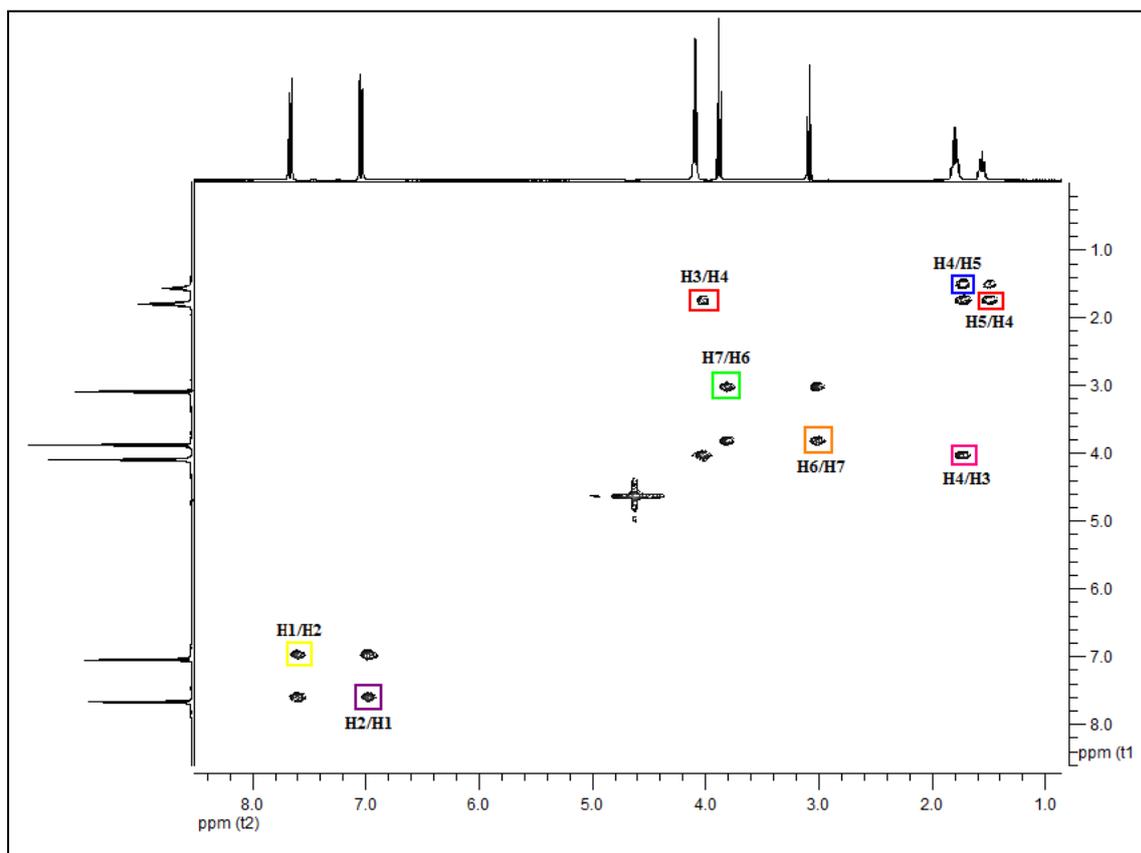


**Figura 28:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a  $\beta$ CD em  $\text{DMSO-d}_6$  ( $27^\circ\text{C}$ ,  $400\text{ MHz}$ ).

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da PNT e dos compostos de inclusão envolvendo  $\beta\text{CD}$  e PNT em diferentes proporções molares (1:1, 2:1, 3:1 e 4:1,  $\beta\text{CD}$ :PNT) foram obtidos em  $\text{D}_2\text{O}$ . As Figura 29 e 30 exibem os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  do fármaco PNT livre, respectivamente. Os sinais dos hidrogênios aromáticos da PNT denominados H1/H1' e H2/H2' podem ser observados respectivamente, em aproximadamente 7,7 e 7,1 ppm. Já os sinais referentes aos hidrogênios alifáticos H3/H3', H4/H4' e H5, são observados em aproximadamente 4,1; 1,8 e 1,6 ppm, respectivamente. Adicionalmente, os sinais dos hidrogênios do isotionato H6 e H7, podem ser observados em 3,1 e 3,9 ppm, respectivamente.



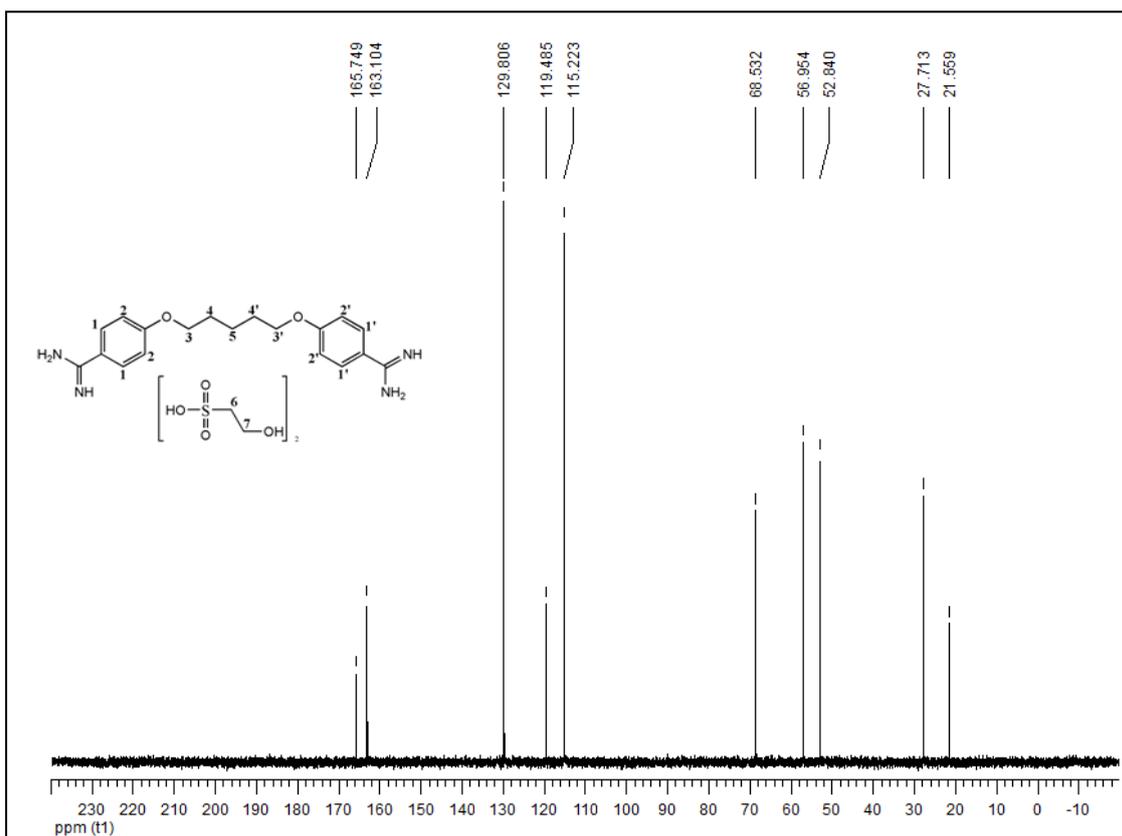
**Figura 29:** Espectro de RMN para o fármaco PNT obtido em  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 30:** Mapa de contorno COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  para PNT, obtido a 400 MHz, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Como pode ser observado no mapa de contorno COSY, exposto na Figura 30, correlações entre os hidrogênios H1/H2, H3/H4, H4/H5 e H6/H7 são observadas, corroborando com as atribuições realizadas previamente.

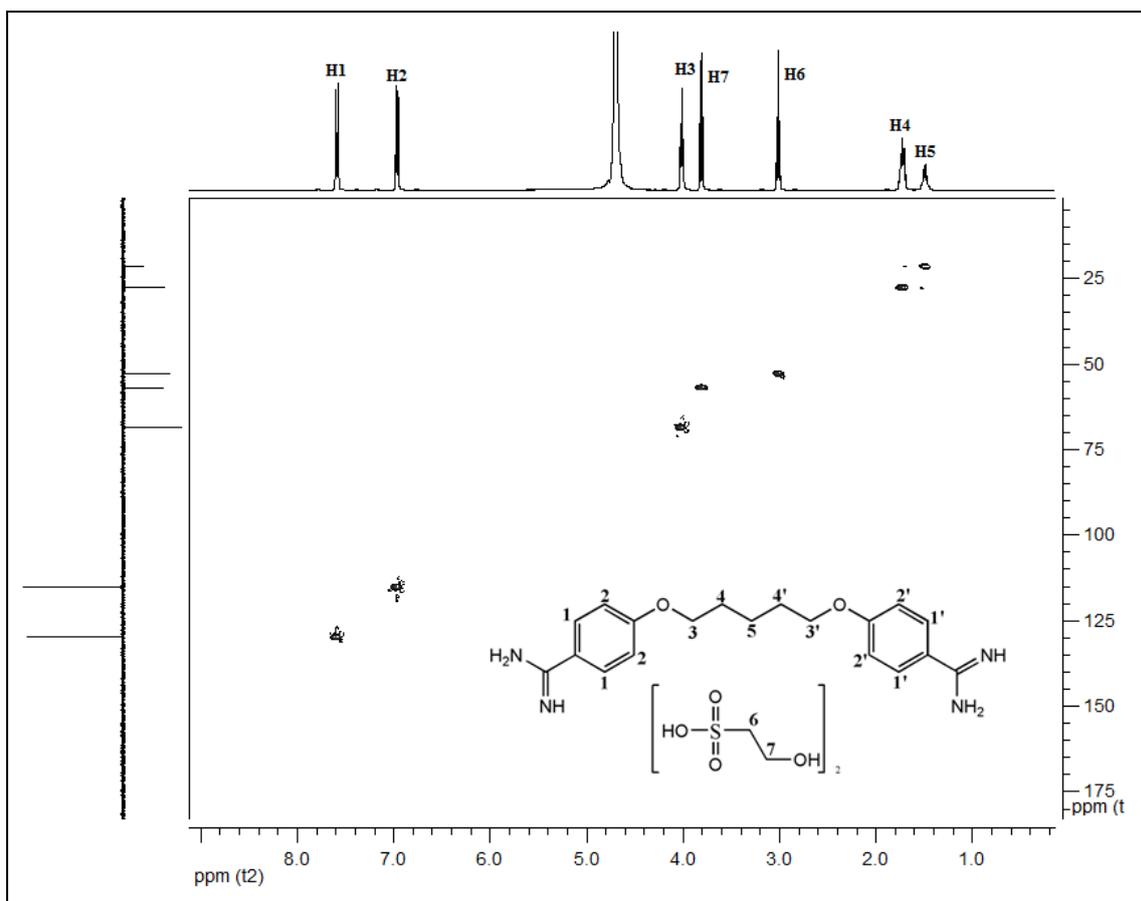
A atribuição dos sinais de carbono para a PNT foi baseada nos experimentos de  $^{13}\text{C}$ , cujo espectro está apresentado na Figura 31, e tiveram como auxílios para sua atribuição o experimento bidimensional HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -DEPT 135, Figura 32, que permitiu determinar a posição dos carbonos diretamente ligados a hidrogênios.



**Figura 31:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a PNT a 400 MHz, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

A capacidade de distinguir determinados tipos de carbono pela intensidade das constantes de acoplamento respectivas, levou à técnica DEPT. A sequência DEPT tornou-se o procedimento de escolha para a determinação do número de hidrogênios diretamente ligados a um átomo de  $^{13}\text{C}$ . Deste modo, pode-se verificar na Figura 32, que no experimento DEPT 135  $^{13}\text{C}$ , o sinal em 165,75 ppm não são observados, sendo o mesmo atribuído aos carbonos dos grupamentos amidínicos. De modo análogo, os sinais observados em 119,49 e 163,10 ppm não foram observados no espectro DEPT 135, uma vez que são referentes aos carbonos aromáticos quaternários diretamente ligados ao grupamento amidínico e à função éter, respectivamente.

Os demais sinais de  $^{13}\text{C}$  para C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7 foram atribuídos aos sinais em 129,81; 115,22; 68,53; 27,71; 21,56; 52,84 e 56,95 ppm, respectivamente.



**Figura 32:** Mapa de contorno HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -DEPT 135 para a PNT a 400 MHz, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

A Figura 33 exibe o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto de inclusão ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )1:1. Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da PNT livre e de seus compostos de inclusão nas razões molares 1:1 e 2:1 ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ ), bem como, a variação dos deslocamentos químicos ( $\Delta\delta = \delta_{\text{PNT}} - \delta_{\beta\text{CD}:\text{PNT}}$ ) são resumidos na Tabela 3.

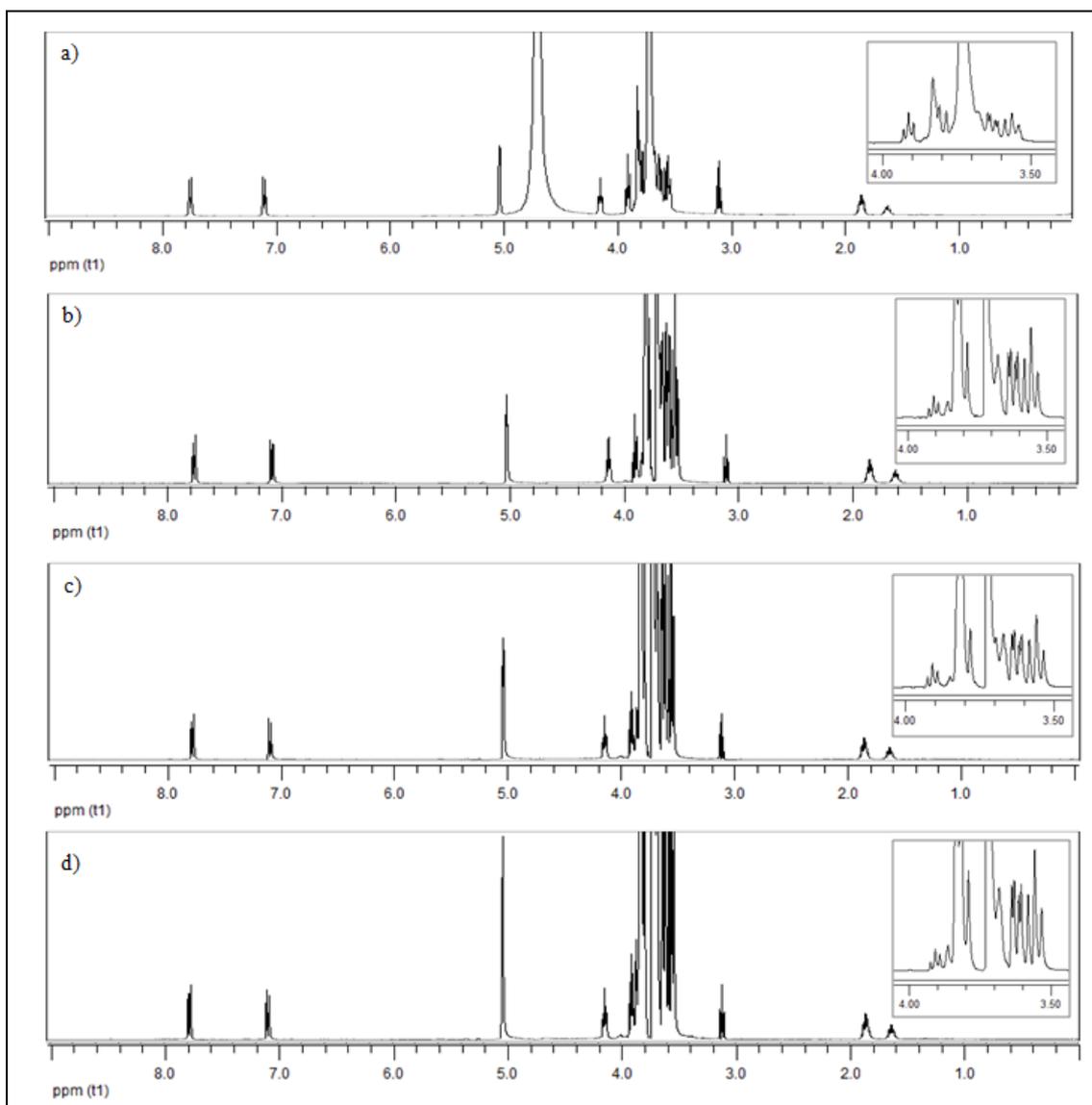
Mudanças nos deslocamentos químicos de hidrogênios da PNT foram observadas na presença de  $\beta\text{CD}$ , quando comparado com os deslocamento de  $^1\text{H}$  do fármaco livre.(Charpentier, Wilder *et al.*, 2008) Estas mudanças são uma evidência da interação entre a PNT e a molécula hospedeira, uma vez que são associadas a mudanças na densidade de elétrons, o que pode estar relacionado à uma variação no ambiente químico do fármaco e conseqüentemente correlacionado à inclusão do mesmo na cavidade de  $\beta\text{CD}$ . (Loftsson e Brewster, 1996; Schneider, Hackett *et al.*, 1998) Nos dois compostos ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )1:1 e ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )2:1, os hidrogênios mais afetados da PNT são o hidrogênio denominado H1 da porção aromática do fármaco e o hidrogênio denominado H5 da porção alifática, sugerindo desta forma, uma inserção profunda do fármaco na cavidade de  $\beta\text{CD}$ .



**Tabela 3:** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  ( em 400MHz) de prótons da pentamidina no fármaco livre e na presença de  $\beta\text{CD}$ , usando  $\text{D}_2\text{O}$  e valores  $\Delta\delta$ .

Atribuição	$\delta$ PNT	$\delta$ ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )1:1	$\Delta\delta$ ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )1:1	$\delta$ ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )2:1	$\Delta\delta$ ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )2:1
H1	7,689	7,864	-0,175	7,862	-0,173
H2	7,065	7,163	-0,098	7,183	-0,118
H3	4,113	4,216	-0,103	4,234	-0,121
H4	1,826	1,930	-0,104	1,949	-0,123
H5	1,589	1,717	-0,128	1,722	-0,133
H6	3,113	3,199	-0,086	3,205	-0,092
H7	3,911	3,995	-0,084	4,002	-0,091

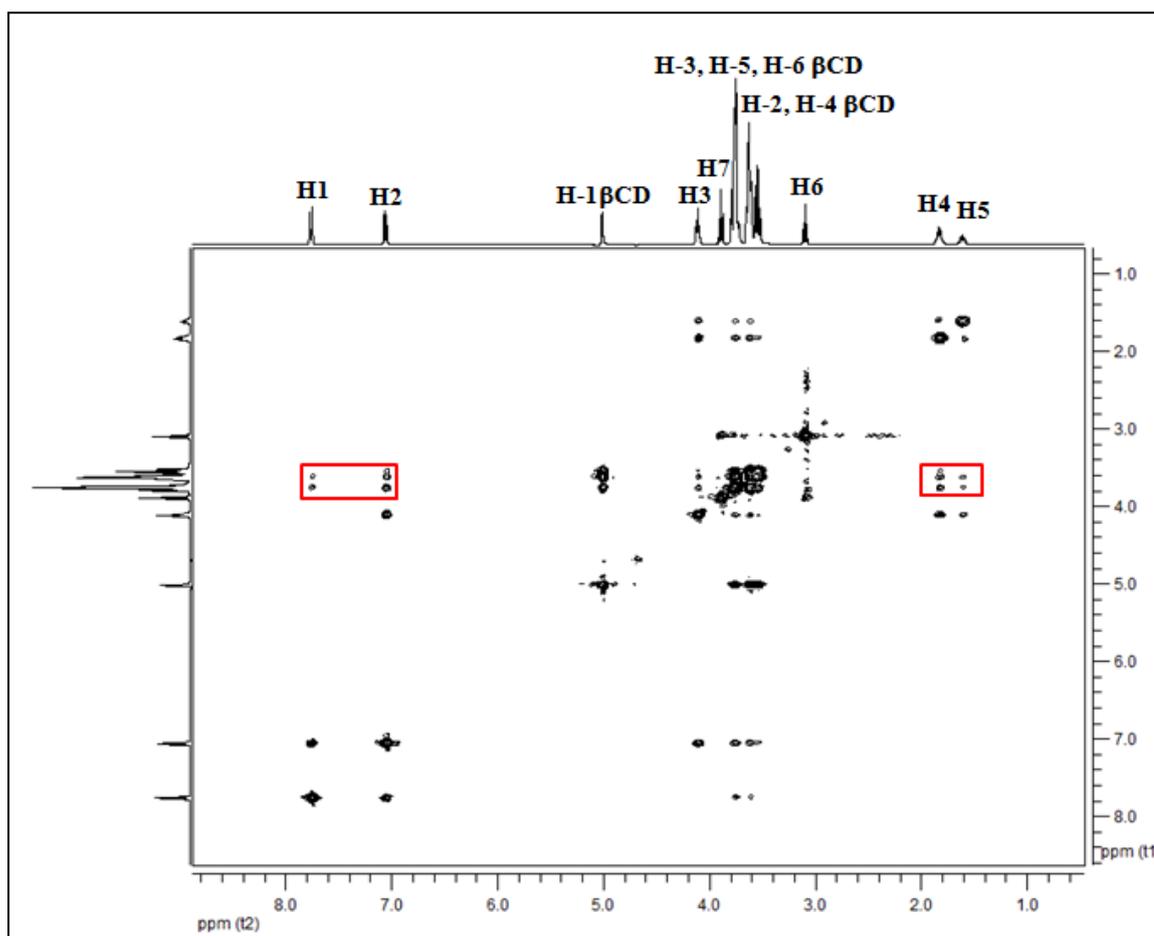
Por outro lado, os hidrogênios da PNT menos afetados são os hidrogênios do grupo isotionato, denominados H6 e o H7, indicando que este grupo não participa no processo de inclusão. Este resultado está de acordo com os dados observados por espectrometria de massa, em que os compostos de inclusão, em geral, não apresentaram o contra-íon isetonato na estrutura supramolecular. Além disso, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos para os compostos ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )3:1 e ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )4:1, não apresentaram diferenças significativas em relação ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  do sistema 2:1, Figura 34, indicando que o aumento da concentração de  $\beta\text{CD}$ , acima da proporção de 2:1, não levou a superestruturas em solução aquosa, como observado através dos experimentos de IES-EM.



**Figura 34:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , na faixa de 4,3 a 3,0 ppm, em 400MHz em  $\text{D}_2\text{O}$  para os compostos de inclusão preparados nas seguintes proporções a) ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )1:1, b) ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )2:1, c) ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )3:1 and d) ( $\beta\text{CD}:\text{PNT}$ )4:1.

Além da análise da variação do deslocamento químico, experimentos utilizando o efeito Nuclear Overhauser (NoE) têm sido aplicados com sucesso para ilustrar a interação intermolecular através do espaço, sendo estas medidas uma das ferramentas mais importantes para confirmar a inclusão do hóspede na cavidade da  $\beta\text{CD}$ . (De Sousa, Denadai, Lula, Nascimento *et al.*, 2008) Este experimento mostra manchas de correlação entre os sinais de hidrogênios, indicando interações a uma curta distância (menor que 5 Å), (Schneider, Hacket *et al.*, 1998; Gibaud, Ben Zitar *et al.*, 2005) devido ao acoplamento dipolar eletromagnético. (Teixeira, Sinisterra *et al.*, 2006).

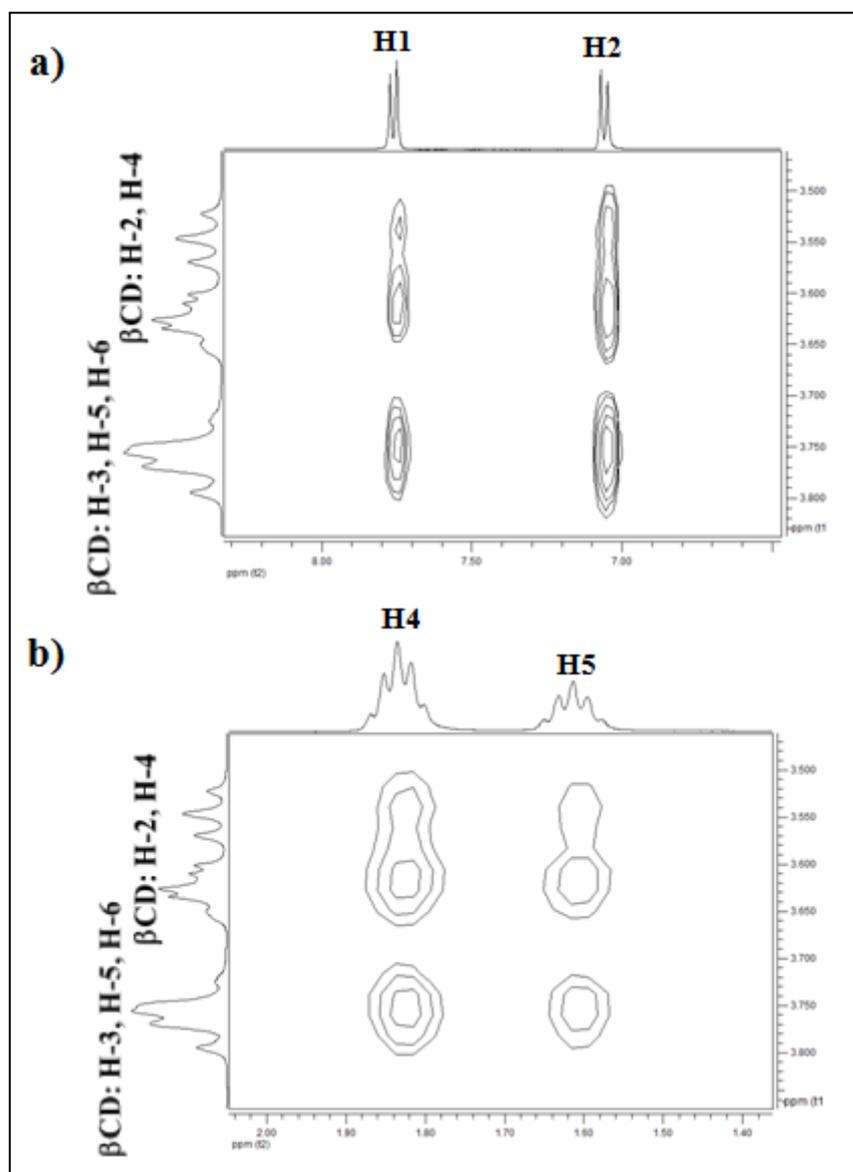
O espectro 2D ROESY do sistema supramolecular ( $\beta$ CD:PNT)1:1 é mostrado na Figura 35, no qual diversas manchas de correlação cruzada podem ser observadas entre os hidrogênios da PNT e da  $\beta$ CD (H-3 e H-5 internos e H-2 e H-4 externos). As Figuras 36a e 36b mostram as expansões das regiões destacadas de vermelho, do mapa de contorno ROESY, as quais apresentam os principais picos de correlação entre  $\beta$  CD e PNT.



**Figura 35:** Ressonância Magnética Nuclear 2D ROESY para o sistema ( $\beta$ CD:PNT)1:1 em  $D_2O$ .

Correlações entre os sinais de hidrogênios aromáticos (H1 e H2) e alifáticos (H4 e H5) da PNT com H-3 e H-5, que são os hidrogênios do interior da cavidade de  $\beta$ CD, podem ser observadas. Tais resultados confirmam a inclusão profunda de PNT na cavidade de  $\beta$ CD, já que não apenas a porção aromática do fármaco é incluída na cavidade, como ocorre usualmente, (Denadai, Teixeira *et al.*, 2007; De Sousa, Denadai, Lula, Lopes *et al.*, 2008) mas também a porção alifática está incluída no interior da

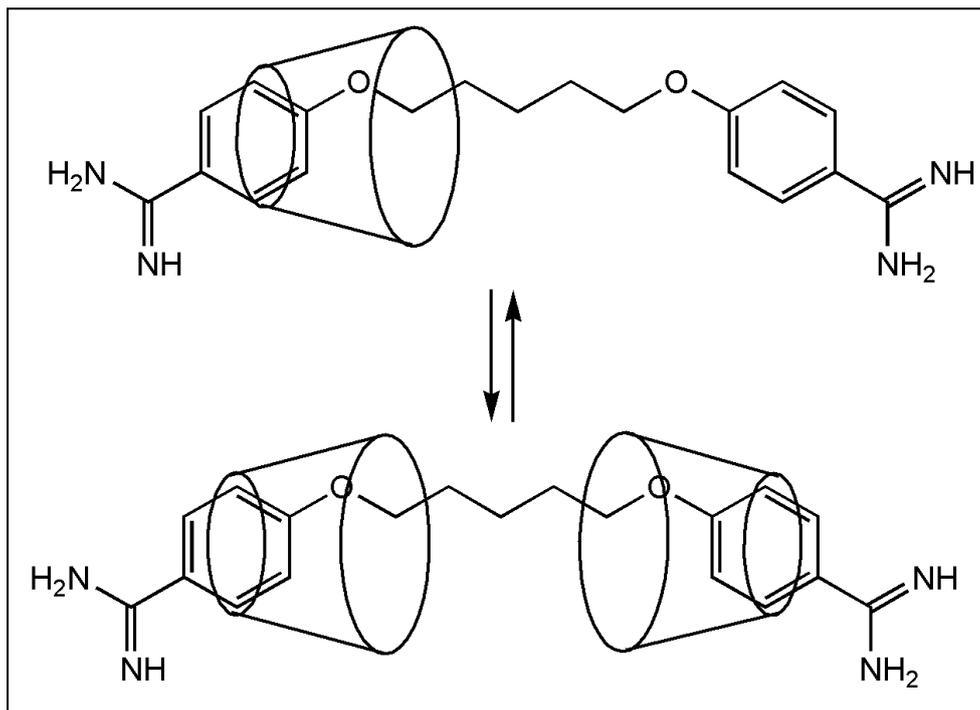
cavidade de  $\beta$ CD. Adicionalmente, as correlações entre os sinais H6 e H7 do isetionato e H-4 e H-2 da parte externa da  $\beta$ CD, podem ser observadas na Figura 35.



**Figura 36:** Expansão do espectro de RMN 2D ROESY para o sistema ( $\beta$ CD:PNT)1:1 a) na região de 7,0-7,8 ppm e b) na região de 1,5-1,9 ppm.

Os resultados 2D ROESY estão de acordo com os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , que indicou a interação do grupo com isetionato com o lado exterior da  $\beta$ CD levando a menor variação de deslocamentos químicos.

Em suma, os resultados obtidos a partir das técnicas de caracterização, realizadas em solução, indicaram a presença de equilíbrios múltiplos formados entre  $\beta$ CD e PNT, conforme ilustrado na Figura 37.



**Figura 37:** Representação esquemática de alguns dos possíveis sistemas formados entre  $\beta$ CD e PNT, que coexistem em equilíbrio em solução.

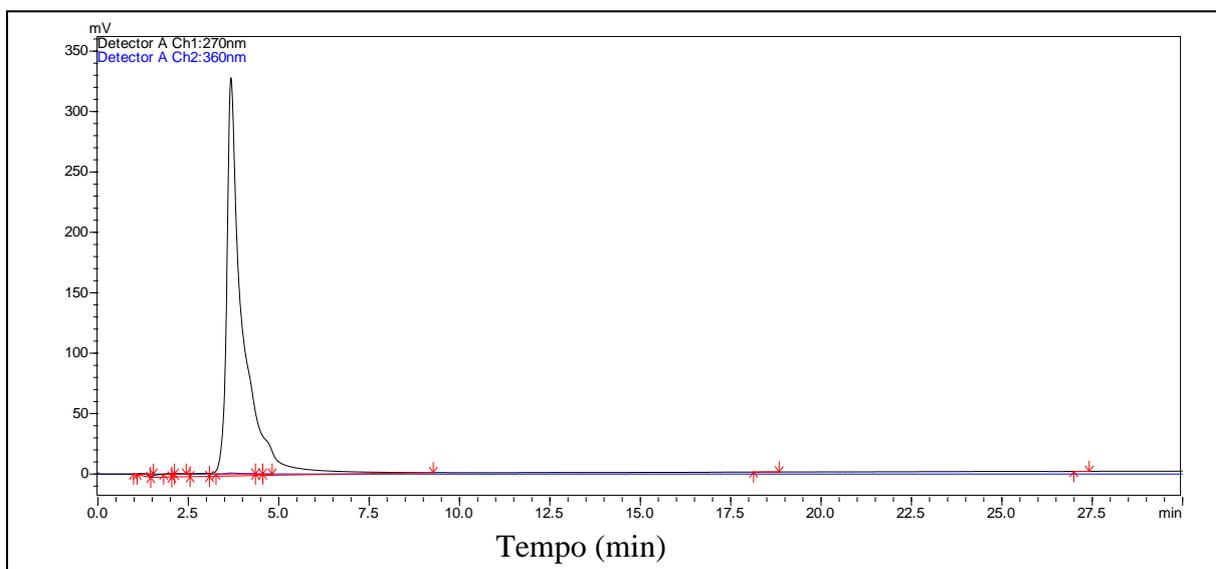
### 3.7. ESTUDO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO PNT LIVRE E NA PRESENÇA DE $\beta$ CD.

É importante relatar a respeito da controvérsia existente na literatura a respeito da estabilidade de sais de pentamidina em solução aquosa. Segundo Thomas P. C. Dorlo e Piet A. Kager, devido a instabilidade da pentamidina em solução aquosa, a mesma está disponível para uso clínico na forma de um sal em pó e reconstituído com água previamente a administração. (Dorlo e Kager, 2008). Por outro lado, é também descrito na literatura, que a Pentamidina é estável em solução aquosa por nove meses. (Paul, Fessi *et al.*, 1997) Em um estudo intitulado “The Chemistry of the Amidines” publicado em 1944, (Shriner e Neumanw, 1944) é descrito que amidinas se hidrolisam facilmente em solução aquosa, formando a amida ou amina correspondente, em geral, com liberação de amônia. Com o intuito de investigar as divergências reportadas na literatura, realizou-se alguns estudos para analisar a degradação do fármaco isotionato de pentamidina livre e na presença de  $\beta$ CD, em solução aquosa, como descrito no Capítulo 2, Seção 2.2.3.

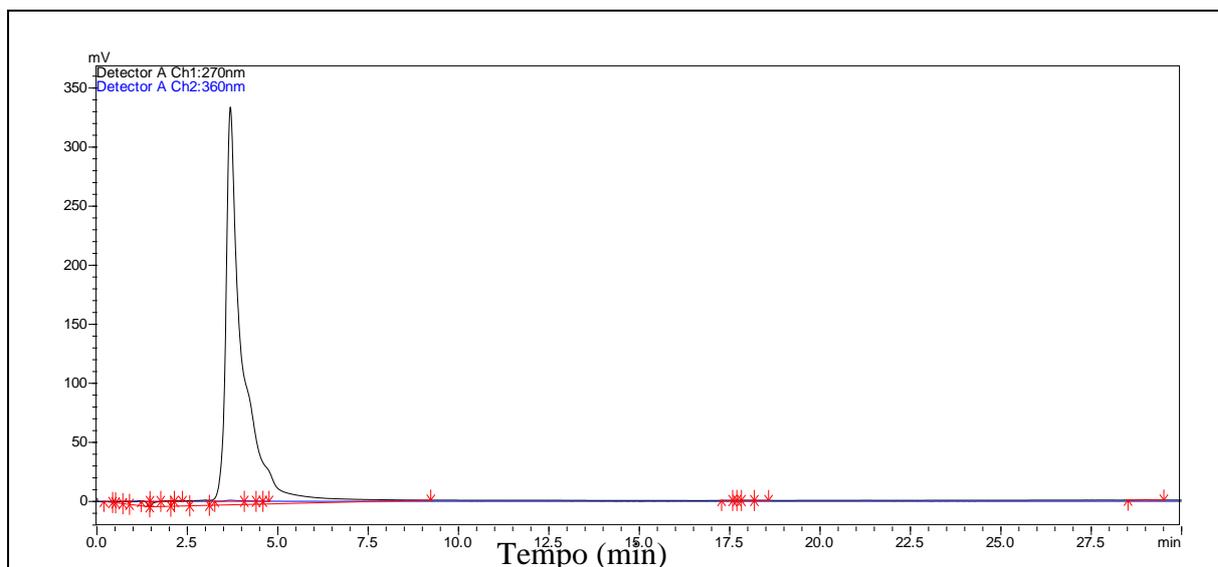
Tendo em vista a basicidade da amônia, sua liberação no meio pode ser facilmente identificada através de um experimento com controle de pH, uma vez que esta liberação seria acompanhada por um aumento gradativo deste. Para tanto, PNT e seu composto de inclusão ( $\beta$ CD:PNT)1:1 foram solubilizados em H<sub>2</sub>O, e o pH da solução foi monitorado ao longo do tempo. Verificou-se que após 48 horas não houve variação do pH das soluções, indicando que se a degradação do fármaco PNT ocorre com liberação de amônia, a referida degradação é muito lenta, nas condições estudadas.

Com o intuito de investigar a estabilidade do fármaco PNT nas condições de uma administração oral, mimetizando tentativamente as condições no estômago, foram planejados experimentos de hidrólise enzimática, os quais foram realizados conforme descrito na Seção 2.2.3 do Capítulo 2.

As análises realizadas por HPLC indicaram que o cromatograma da amostra 61, Figura 39, contendo PNT em pH= 2 na presença de pepsina, após 14 horas de reação, não apresentou alterações em relação ao da amostra 1, exposto na Figura 38, contendo apenas o fármaco PNT em pH2, indicando que a degradação do fármaco não ocorreu ou não foi possível identificá-la pela referida técnica.



**Figura 38:** Cromatograma (HPLC) obtido para o Isotionato de Pentamidina em pH 2 para a amostra 1.



**Figura 39:** Cromatograma (HPLC) obtido para o Isotionato de Pentamidina em pH 2 na presença de pepsina, após 14 horas de reação (amostra 61).

### 3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA EM MODELO DE LEISHMANIOSE VISCERAL MURINO

Como descrito anteriormente, os principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose exigem administração parenteral e apresentam efeitos colaterais, o que leva a problemas como: baixa adesão, terapias inadequadas e aumento da resistência do parasita a esses fármacos. Compostos com administração oral podem resultar em menor toxicidade e maior comodidade ao tratamento.

O objetivo desta etapa do projeto foi comparar a eficácia do composto de inclusão ( $\beta$ CD:PNT)1:1 administrado por via oral, no tratamento da leishmaniose visceral causada por *Leishmania Chagasi*, com o fármaco de primeira escolha Glucantime administrado por via parenteral e com o Isotionato de Pentamidina livre, administrado por via oral. Para tanto ensaios biológicos foram realizados em colaboração com os professores Dr. Frédéric Jean Georges Frezard e Dra. Maria Norma Melo e com a aluna de doutorado Flaviana Ribeiro.

No experimento aqui relatado, foram utilizados camundongos fêmeas, da raça BALBc, os quais foram infectados pela veia lateral da cauda com  $10^6$  promastigotas de *L. infantum chagasi* (MHOM/BR/70/BH-46).

Os grupos contendo cinco camundongos isogênicos da raça BALB/c foram formados aleatoriamente por fêmeas com idade de 8-12 semanas e peso de 18-22 g

obtidos do CEBIO-ICB UFMG, tais animais receberam por gavagem as formulações e doses indicadas na tabela 4.

Como pode ser observado na Tabela 4, o grupo de estudo foi tratado com a ( $\beta$ CD:PNT)1:1 com dose de 145mg/kg/dia por via oral. A referida dose foi calculada para que apresentasse a mesma proporção do fármaco PNT livre (50 mg/kg/dia). O grupo controle positivo ou padrão ouro foi tratado com Glucantime® 200mg/kg/dia por via parenteral e o grupo controle negativo foi tratado com cloreto de sódio 0,9% uma vez ao dia, no mesmo volume do grupo de estudo, que foi de 0,3mL. A quimioterapia teve duração 20 dias, dose única diária, e realizada após oito dias do aparecimento de infecção.

**Tabela 4:** Descrição do tratamento dos grupos de camundongos com especificação das formulações e doses administradas.

Grupos	Tratamento
1	Salina
2	Glucantime 200mg/kg - parenteral
3	Isotionato de Pentamidina 50mg/Kg
4	( $\beta$ CD:PNT)1:1 (145mg/Kg)
5	$\beta$ CD

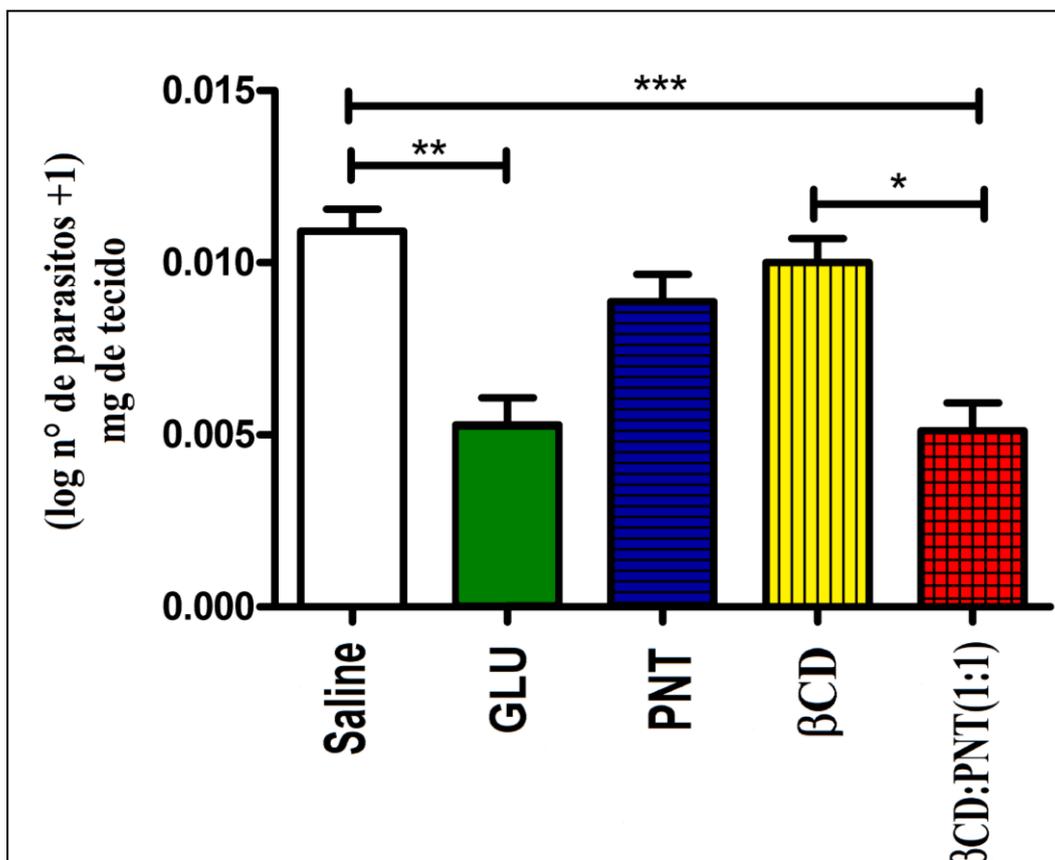
Os animais foram acompanhados para registrar o aparecimento das lesões cutâneas e/ ou sintomas adversos como hemorragia. Após a quimioterapia, ou seja, após o 21° dia contado após o início do tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento da cervical, após sedação por quetamina/xilazina, e em seguida foi realizada a coleta de baço e fígado. Os órgãos foram pesados em balança analítica e processados para utilização nos protocolos de quantificação de parasitas pela técnica de diluição limitante e histologia.

O método de diluição limitante foi utilizado para estimar o número de formas amastigotas viáveis no fígado e baço dos animais de cada grupo estudado. Os órgãos foram macerados e homogeneizados de forma asséptica para a suspensão das formas

amastigotas. O material resultante foi diluído sob potência de dez, em meio RPMI acrescido de 20% de soro bovino fetal, e distribuído em uma placa tipo ELISA fundo chato, 96 poços, com 03 repetições para cada título. Caso haja uma amastigota em cada poço, crescerão formas promastigotas que serão cultivadas por cerca de 10 dias em estufa a 26°C. A leitura foi feita em microscópio de luz invertida sob objetiva de 20 vezes, onde foram contadas as formas promastigotas de cada poço.

Os dados foram tratados no software PRISMA e em seguida foram analisados segundo *1-way-ANOVA*, pois todos os dados passaram no teste de normalidade. Os Gráficos 2 e 3 foram obtidos para fígado e baço, respectivamente.

**Gráfico 2:** Índice de parasitemia no fígado.



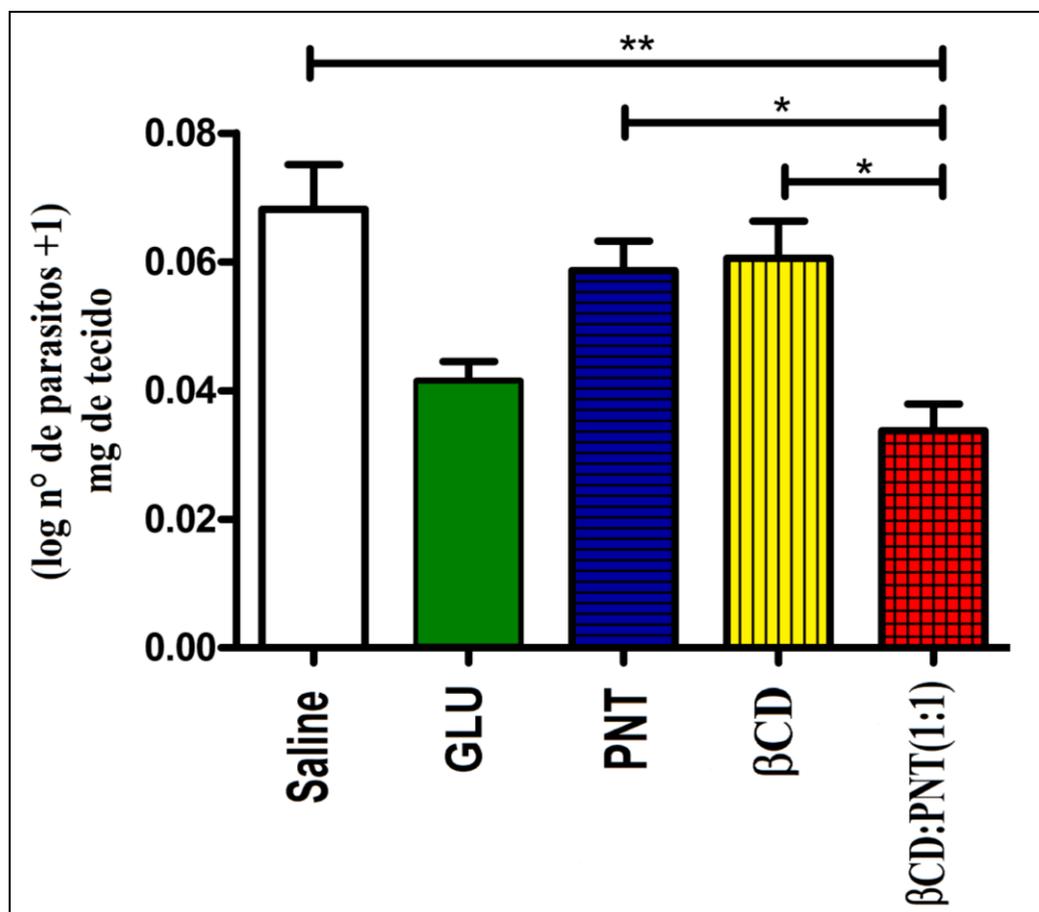
\* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$

A partir da análise dos gráficos, observa-se que tanto no fígado quanto no baço, não houve diferença entre o grupo tratado com PNT na dose de 50mg/kg, quando comparado ao grupo controle tratado com solução salina, como era esperado já que o

referido fármaco não apresenta atividade por via oral. Entretanto, ao compararmos nos dois órgãos, o grupo tratado com ( $\beta$ CD:PNT)1:1 com os grupos tratados com salina,  $\beta$ CD e PNT, observamos uma significativa redução da parasitemia pelo composto de inclusão. O composto de inclusão apresentou maior redução da parasitemia no baço em relação ao fígado.

Os resultados indicaram que o processo de encapsulação da PNT com  $\beta$ CD, alterou as características de absorção do referido fármaco, tornando esse método uma alternativa promissora ao tratamento da Leishmaniose.

**Gráfico 3:** Índice de parasitemia no baço.



\*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO: SISTEMA $\beta$ -CICLODEXTRINA/ARTESUNATO.

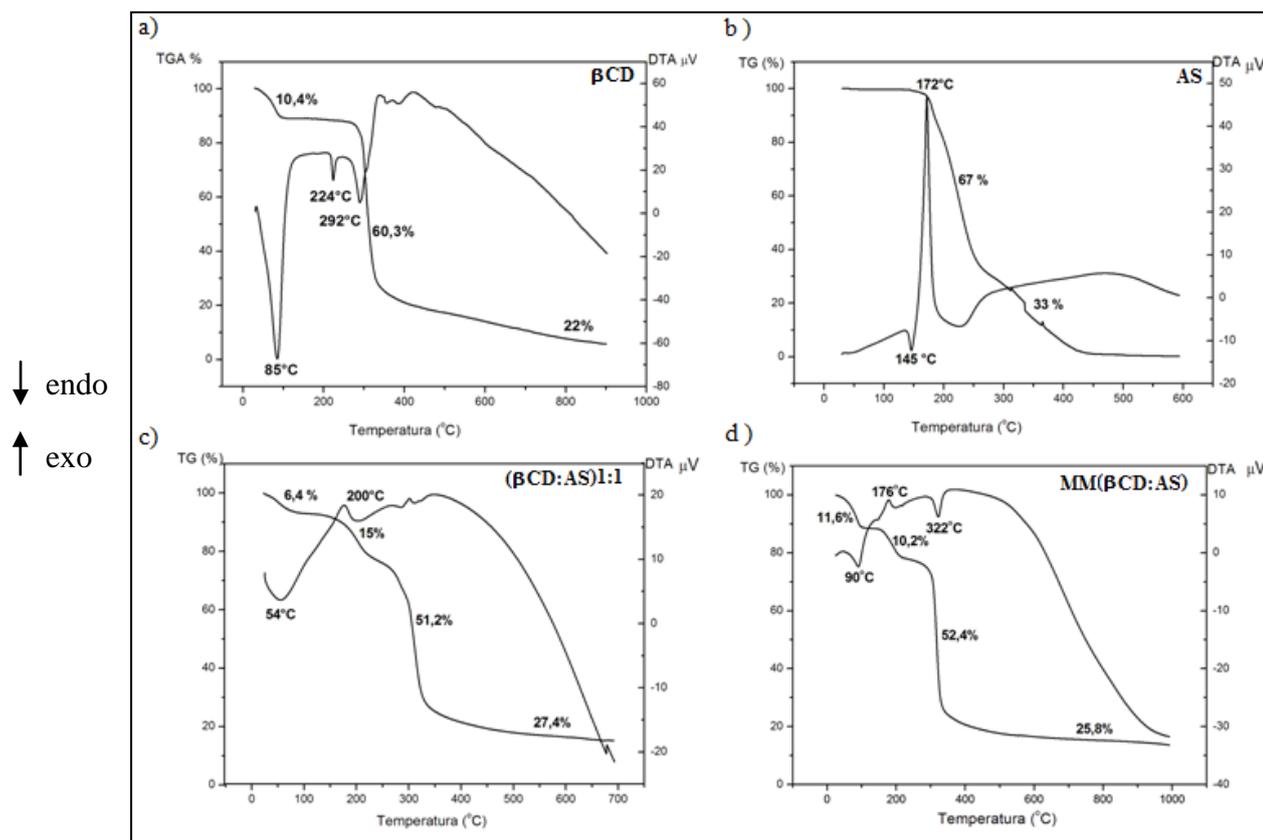
Como descrito na seção 1.4 do Capítulo 1, compostos a base de artemisinina representam atualmente uma classe de antimaláricos com expressiva atividade terapêutica. Derivados como o artesunato, foram sintetizados com o intuito de obter compostos com maior solubilidade em água em relação ao precursor artemisinina, sendo que a síntese de análogos ocupa uma posição de destaque ainda hoje. (Vennerstrom, Arbe-Barnes *et al.*, 2004; Dong, Chollet *et al.*, 2005; Griesbeck e El-Idreesy, 2006; Posner, Chang *et al.*, 2006; Benoit-Vical, Lelievre *et al.*, 2007; Singh, Sharma *et al.*, 2007); (Magueur, Crousse *et al.*, 2004; Griesbeck, El-Idreesy *et al.*, 2005; Jin, Zhang *et al.*, 2006; Tang, Dong *et al.*, 2007; Ingram, Yaremenko *et al.*, 2012; Li, Hao *et al.*, 2012)

Sistemas de liberação controlada tem sido considerados uma interessante alternativa farmacêutica nos últimos anos, (Chu, Yamaguchi *et al.*, 2002) e para obtenção de tais sistemas, algumas estratégias tem sido exploradas. (Xiao, Chu *et al.*, 2003; Xiao, Chu *et al.*, 2004; Zhu, Shi *et al.*, 2005; Ju, Chu *et al.*, 2006; Ju, Chu *et al.*, 2008) A literatura reporta trabalhos envolvendo artesunato e nanocápsulas através de um método proposto para aumentar a biodisponibilidade de solutos hidrofóbicos. (Xiao e Hong, 2010) Adicionalmente, a encapsulação de artesunato em lipossomas foi também descrita na literatura com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais, minimizar a degradação e aumentar a solubilidade em soluções aquosas. (Groll, Petraitis *et al.*, 1999; West e Rodman, 2001; Gabriels e Plaizier-Vercammen, 2003) Por sua vez, a utilização de ciclodextrinas para aumentar a solubilidade de fármacos é amplamente descrita na literatura, e foi utilizada nos sistemas contendo artesunato, descritos neste capítulo, com esse propósito.

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para a caracterização dos compostos formados pela interação entre a  $\beta$ CD e o antimalárico artesunato, denominado AS, a diferentes razões molares, e ainda a caracterização físico-química do referido fármaco, através das metodologias descritas no Capítulo 2. A seguir serão expostos os dados obtidos a partir das caracterizações realizadas no estado sólido e em seguida aqueles obtidos em solução.

#### 4.1. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.

Ao estudar o comportamento térmico dos compostos envolvendo  $\beta$ CD e artesunato, foram obtidas as curvas expostas na Figura 40. A curva termogravimétrica para a  $\beta$ CD, descrita na seção 3.1 (Capítulo 3), é exposta na Figura 40a. Já a Figura 40b exibe a curva TG para o fármaco AS, a qual apresenta um patamar de estabilidade até 160°C seguido de dois eventos de perda de massa relativos à termod decomposição do fármaco.



**Figura 40:** Curvas termogravimétricas: a)  $\beta$ CD, b) AS, c) ( $\beta$ CD:AS)1:1 e d) MM( $\beta$ CD:AS).

A curva DTA para AS exibe um pico endotérmico em 145°C pouco intenso que não está associado a qualquer perda de massa, indicando um processo físico atribuído a uma transformação reversível do AS. Esse pico é seguido por outro fortemente exotérmico em 172°C referente à termod decomposição do fármaco.

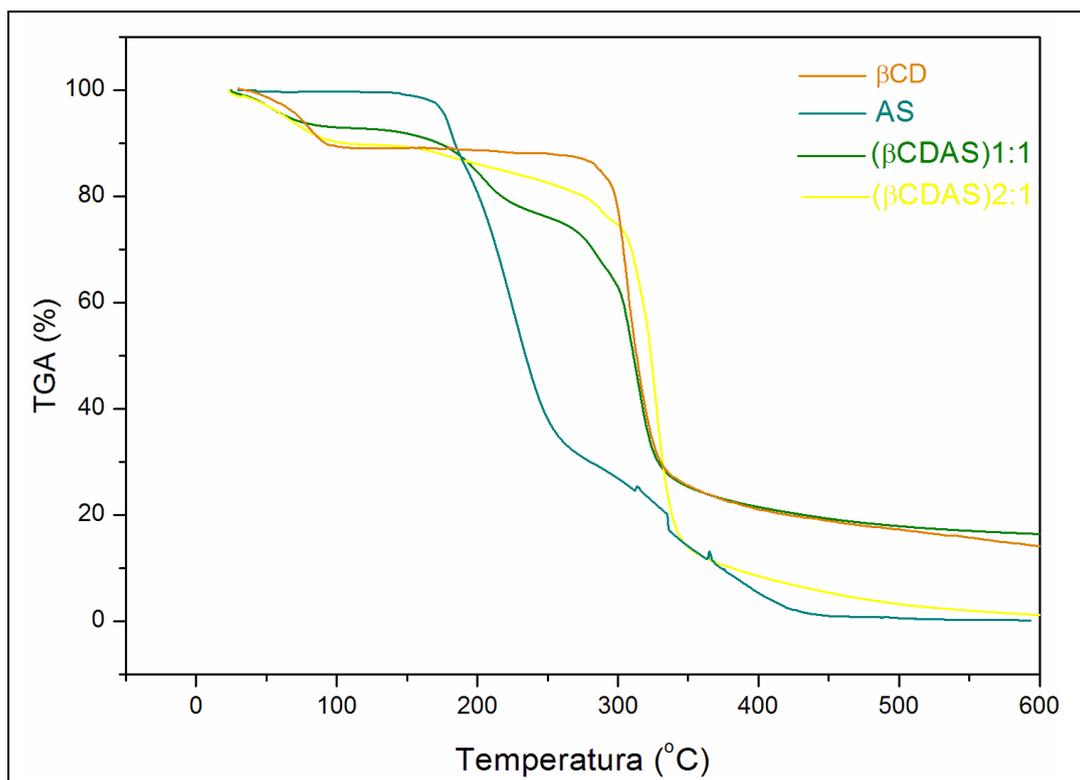
As curvas termogravimétricas obtidas para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 e para a mistura mecânica MM( $\beta$ CD:AS) estão expostas nas Figuras 40c e 40d, respectivamente. Inicialmente observa-se a presença de eventos menos definidos na curva do composto

( $\beta$ CD:AS)1:1 quando comparado a curva do composto MM( $\beta$ CD:AS), indicando interação entre os precursores  $\beta$ CD e AS no complexo ( $\beta$ CD:AS)1:1. A curva TG do composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 apresenta o primeiro evento de perda de massa de 6,4% na faixa de temperatura 24-80°C, o qual é atribuído à saída de moléculas de água. O referido evento é acompanhado na curva DTA por um pico endotérmico em 54°C. Os dois eventos de perda de massa seguintes são relativos à termodecomposição do composto, seguida por um resíduo de 27,4 %. Por outro lado, a curva TG da mistura mecânica exibe três eventos bem definidos similares aos eventos observados nas curvas termogravimétricas dos precursores livres. O primeiro evento de 11,6% é similar àquele observado para a  $\beta$ CD, a segunda perda de 10,2 % é relativa à termodecomposição do fármaco AS, sendo acompanhada de um evento endotérmico em 176 °C, tal como foi observado para o fármaco livre. A terceira perda é atribuída à termodecomposição da  $\beta$ CD.

De modo análogo ao sistema envolvendo  $\beta$ CD e PNT, descrito no Capítulo 3, e à sistemas similares descritos na literatura, (Dong, Qi *et al.*, 2007; Yang, Lin *et al.*, 2009) as propriedades térmicas do fármaco AS foram alteradas após a inclusão, sugerindo a existência do composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 na fase sólida.

A Figura 41 traz as curvas termogravimétricas dos compostos ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1, bem como dos precursores  $\beta$ CD e AS. Através da comparação do comportamento térmico dos referidos compostos, observamos um perfil muito distinto do ( $\beta$ CD:AS)2:1 em relação ao ( $\beta$ CD:AS)1:1. Por outro lado, o comportamento térmico do composto ( $\beta$ CD:AS)2:1 é muito similar ao da molécula hospedeira  $\beta$ CD, não permitindo inferir sobre a formação do composto de inclusão ( $\beta$ CD:AS)2:1, no estado sólido.

O excesso de  $\beta$ CD poderia tanto favorecer a formação de um composto ( $\beta$ CD:AS)2:1, o que poderia levar a interações intermoleculares mais fortes entre a molécula hóspede e a hospedeira e conseqüentemente à presença de eventos menos definidos na TG, como também a  $\beta$ CD poderia ficar em excesso no sistema, o que poderia levar à análises com perfil mais próximo ao da referida macromolécula. Desta forma, outras técnicas de caracterização se fizeram necessárias para esclarecer o sistema denominado ( $\beta$ CD:AS)2:1.



**Figura 41:** Curva termogravimétrica para os precursores  $\beta$ CD e AS e para os compostos ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1.

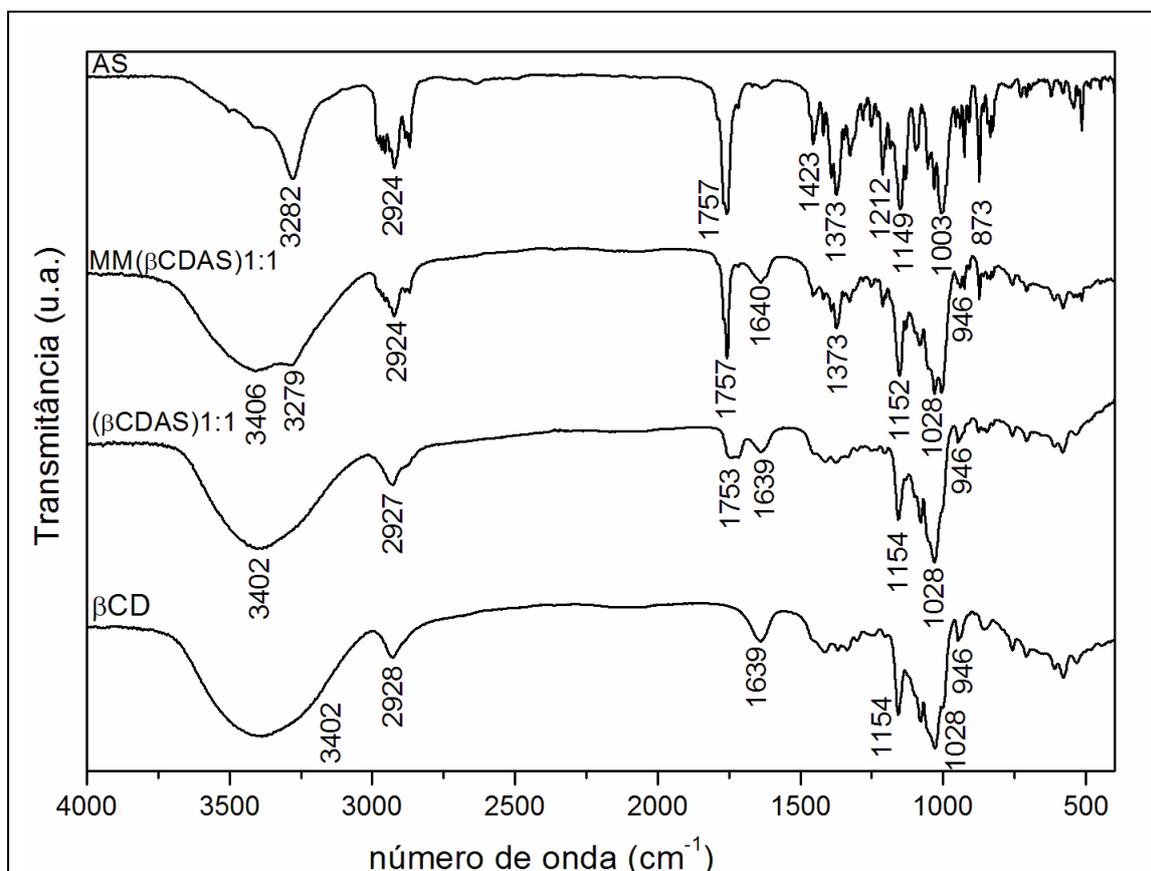
#### 4.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A Figura 42 exibe os espectros vibracionais na região do infravermelho para os precursores  $\beta$ CD e AS, bem como para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 obtido por “spray-drying” e para a mistura mecânica MM( $\beta$ CD:AS).

As principais atribuições para o espectro vibracional da  $\beta$ CD foram descritas anteriormente (Capítulo 3, Seção 3.2). Por outro lado, no espectro de infravermelho obtido para o fármaco livre AS observam-se bandas bem definidas, sendo que na região de  $1430\text{-}850\text{ cm}^{-1}$  um grande número de modos vibracionais estão presentes, assim como no espectro da molécula hospedeira  $\beta$ CD, dificultando desta forma as atribuições nessa região. A banda observada no espectro do fármaco livre em  $3282\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao modo de vibração  $\nu(\text{O-H})$  e as bandas observadas em aproximadamente  $2920\text{ cm}^{-1}$ , são atribuídas ao estiramento das ligações C-H tanto da cadeia alifática cíclica como da acíclica. O modo vibracional observado em  $1757\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento

$\nu(\text{C}=\text{O})$  da carbonila de éster. Já as bandas observadas em 1423 e 1373 são atribuídas respectivamente aos modos  $\delta(\text{O}-\text{H})$  e  $\delta(\text{C}-\text{H})$ . Em 1149 e 1003, são observadas bandas atribuídas a  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ , como descrito na literatura. (Ansari, Iqbal *et al.*, 2009)

De modo análogo ao observado no espectro de absorção na região do infravermelho para o composto  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})1:1$ , descrito no capítulo 3, o espectro do composto  $(\beta\text{CD}:\text{AS})1:1$  exibe uma significativa redução dos modos vibracionais e das intensidades relativas, em relação ao fármaco AS livre. O modo vibracional do fármaco AS mais expressivo no espectro do composto  $(\beta\text{CD}:\text{AS})1:1$  é referente ao  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , o qual é observado em  $1757\text{ cm}^{-1}$ . O referido modo indica a presença do fármaco AS no composto  $(\beta\text{CD}:\text{AS})1:1$ , além disso sua baixa intensidade pode estar relacionada a participação deste grupo no processo de inclusão, já que é observado na mistura mecânica de forma similar ao fármaco livre.



**Figura 42:** Espectros vibracionais na região do infravermelho obtido para os precursores  $\beta\text{CD}$  e AS e para os compostos  $(\beta\text{CD}:\text{AS})1:1$  e  $\text{MM}(\beta\text{CD}:\text{AS})$ .

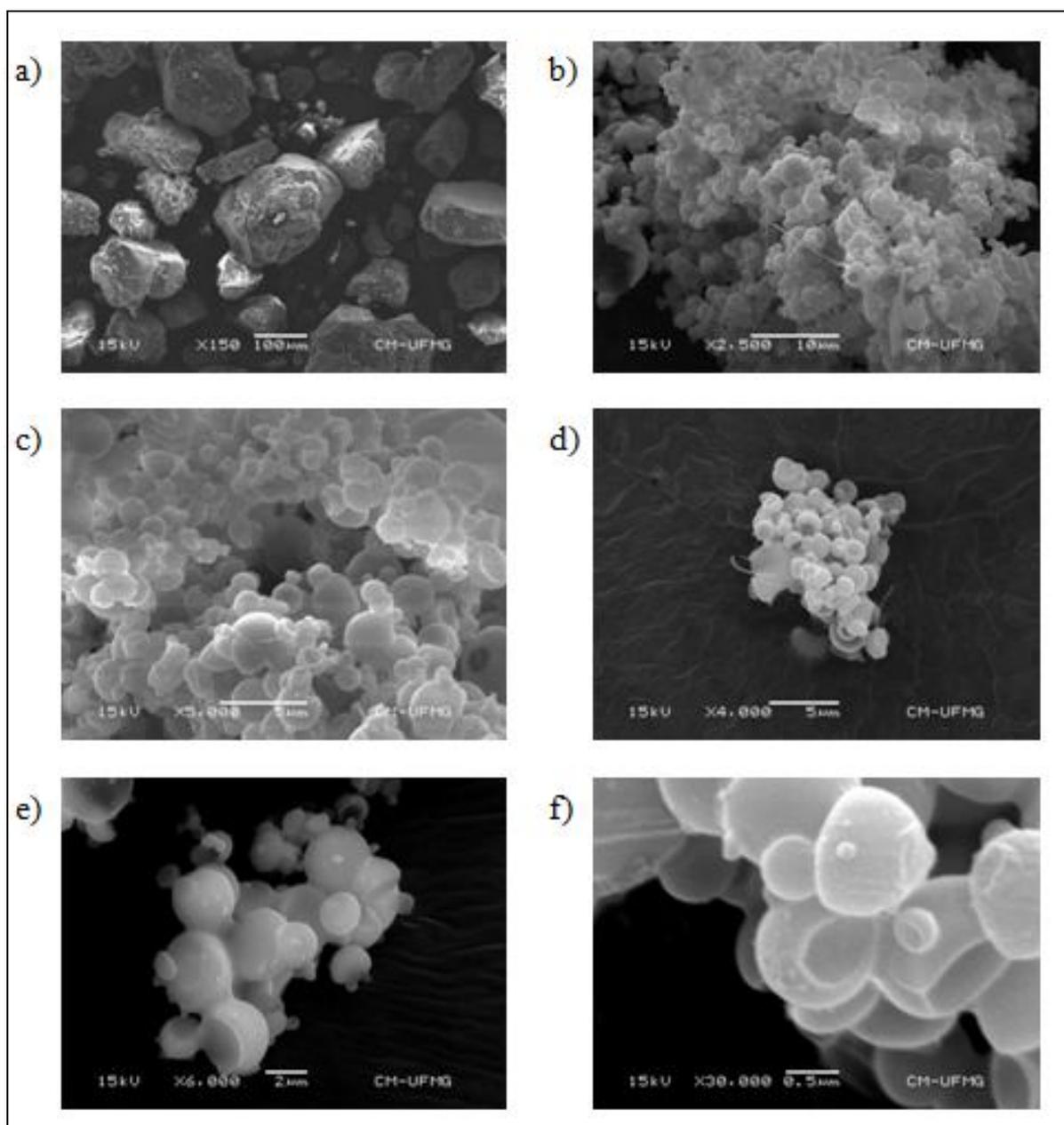
Por outro lado, algumas alterações com relação ao espectro da  $\beta$ CD livre são mais relevantes como o afilamento suave da banda atribuída ao  $\nu(\text{O-H})$  e da banda referente ao estiramento (C-O-C) das ligações glicosídicas, bem como a presença da banda em  $946\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração do anel. Tais observações indicam o possível rompimento de ligações de hidrogênio entre moléculas de água presentes na cavidade da  $\beta$ CD com a inclusão do artesunato e ainda fornecem indícios de que a estrutura da  $\beta$ CD se mantém preservada mesmo após a possível inclusão do fármaco na cavidade da mesma. (Kamphorst, De Sa *et al.*, 2004; Passos, De Sousa *et al.*, 2012)

No espectro da mistura mecânica MM( $\beta$ CD:AS), podem ser observados modos vibracionais de ambos  $\beta$ CD e AS, podendo o referido espectro ser considerado como uma soma dos espectros individuais dos precursores.

#### 4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O exame morfológico das partículas dos produtos envolvendo  $\beta$ CD e AS, obtidos por nebulização, foi realizado através de microscopia eletrônica de varredura em microscópio eletrônico JSM 5800. As amostras foram distribuídas sobre suportes de metal e revestidas com filme de ouro.

A análise morfológica para o AS livre exposta na Figura 43a, indica um aspecto amorfo do fármaco com estrutura compacta. Já as imagens das partículas secas por nebulização obtidos em Mini spray-dryer Büchi 190®, referentes aos sistemas ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1, estão dispostas aleatoriamente nas Figuras 43(b-f). As imagens mostraram que os referidos compostos não apresentam diferenças morfológicas, se caracterizando como um sólido branco, com aspecto pulveréio fino, com formação de pequenos aglomerados. Na Figura 43f, tais aglomerados podem ser observados com uma aproximação de 30000 vezes, permitindo a visualização mais detalhada dos mesmos, os quais apresentam aspecto de esferas ocas, sendo este perfil característico de amostras obtidas por nebulização.

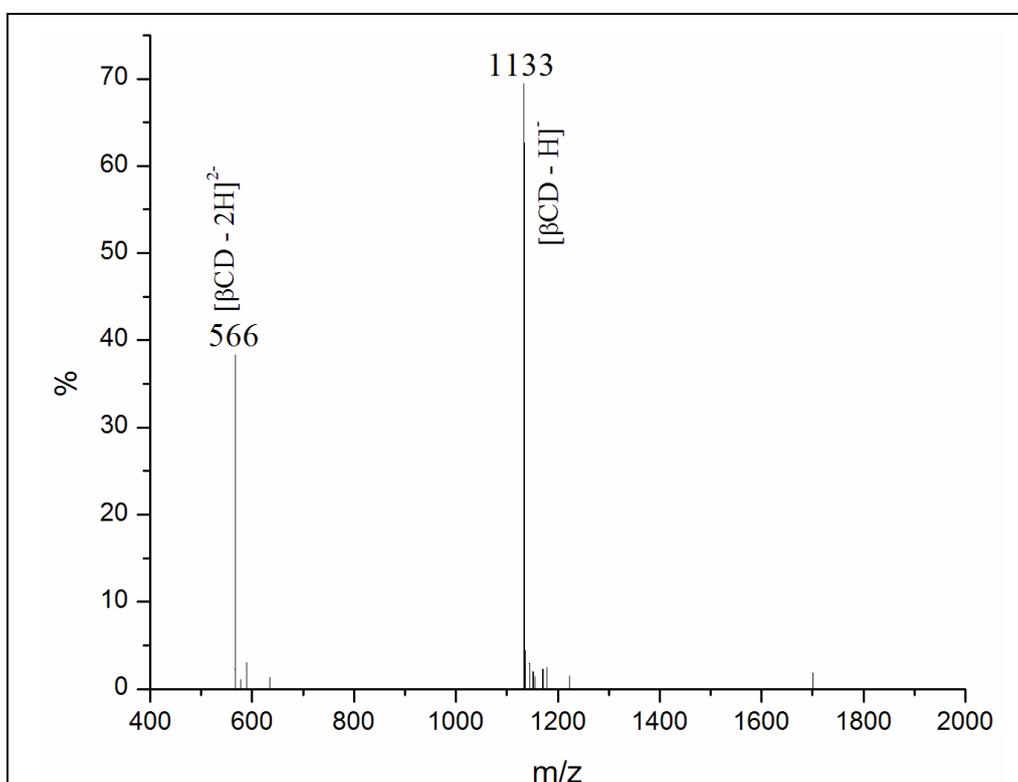


**Figura 43:** Microscopia Eletrônica de Varredura para: a) AS, b) (βCD:AS)1:1 (zoom 2500), c) (βCD:AS)2:1 (zoom 5000), d) (βCD:AS)1:1 (zoom 4000), e) (βCD:AS)2:1 (zoom 6000) e f) (βCD:AS)1:1 (zoom 30000).

#### 4.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY

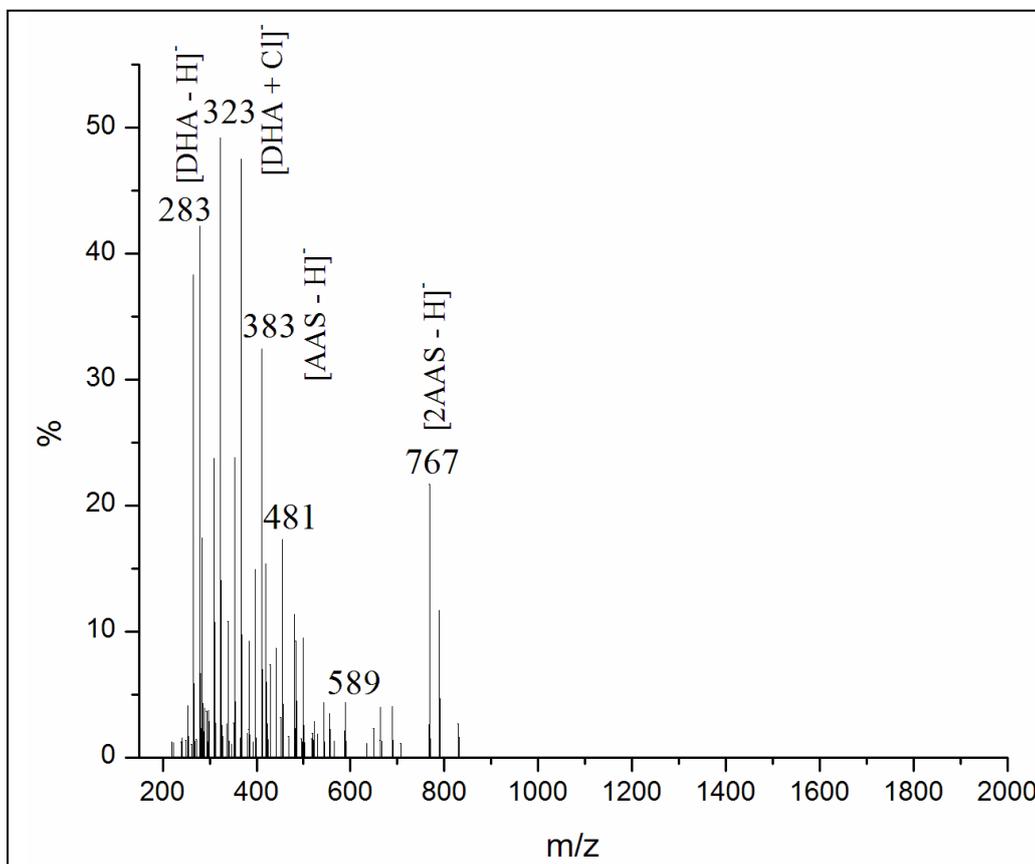
A técnica Espectrometria de massa com ionização por “eletrospray” (IES-EM) foi empregada, para o estudo em solução, do sistema formado entre AS e  $\beta$ CD . A referida técnica é muito eficiente para detectar a formação de compostos de inclusão em solução, tendo sido utilizada para sistemas similares. (Denadai, Teixeira *et al.*, 2007; De Paula, De Sousa *et al.*, 2012)

A técnica IES-MS foi usada tanto no modo positivo quanto no modo negativo. Entretanto, serão descritos apenas os dados obtidos no modo negativo pois estes foram os mais conclusivos. Os sistemas analisados incluem os precursores,  $\beta$ CD e AS, bem como seus compostos de inclusão preparados nas proporções ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1. Inicialmente, o espectro IES (-)-EM da  $\beta$ CD livre é apresentado na Figura 44. Nesse espectro podemos observar a presença de apenas dois íons moleculares, sendo o íon molecular com razão m/z de 566 atribuído à espécie duplamente desprotonada da  $\beta$ CD ( $[\beta\text{CD} - 2\text{H}]^{2-}$ ), e o íon com m/z equivalente a 1133 atribuído à forma desprotonada, ou seja,  $[\beta\text{CD} - \text{H}]^-$ .



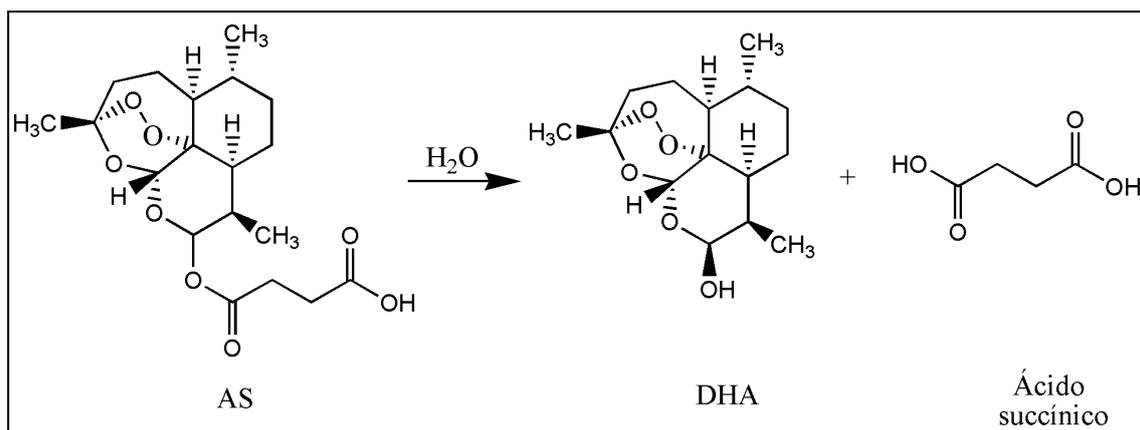
**Figura 44:** Espectro (IES (-)-EM) obtido para  $\beta$ CD.

O espectro de massa do fármaco livre está exposto na Figura 45. Para análise dos íons moleculares presentes nesse espectro deve-se considerar a hidrólise do artesunato, uma vez que, como descrito na literatura, (Teja-Isavadharm, Siriyanonda *et al.*, 2010) o mesmo se hidrolisa liberando diidroartemisinina (DHA) e ácido succínico (SUC), como ilustrado no esquema da Figura 46. A DHA é insolúvel em água, o que limita as opções de formulações para sistema de liberação intravenosos, além disso, sua estabilidade não é totalmente conhecida. DHA apresenta diversas vantagens em relação aos seus análogos arteéter, arteméter e ácido artesúnic, uma delas é o fato de ser facilmente produzida através de algumas etapas de síntese e seu baixo custo. (Ansari, Iqbal *et al.*, 2009)



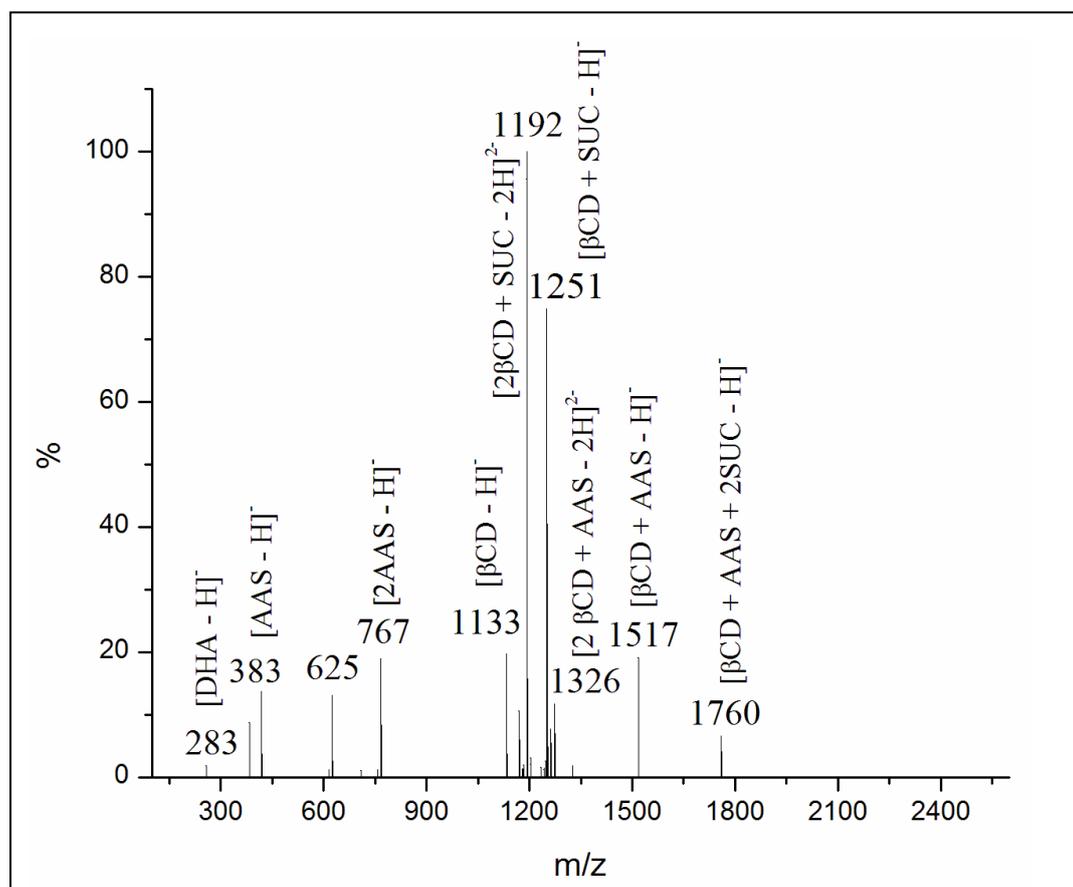
**Figura 45:** Espectro (IES (-)-EM) obtido para AS.

Deste modo, o íon molecular de m/z 283 foi atribuído à forma desprotonada da DHA, através da hidrólise da parte terminal do fármaco, ou seja, [DHA - H]⁻, enquanto m/z 323 foi atribuído à espécie DHA clorada, [DHA + Cl]⁻. Além disso, os íons de m/z 383 e 767 foram atribuídos aos íons desprotonados de ácido artesúnic (AAS) monômero [AAS - H]⁻ e dímero [2AAS - H]⁻, respectivamente.



**Figura 46:** Representação esquemática do processo de hidrólise do fármaco AS, formando DHA e ácido succínico.

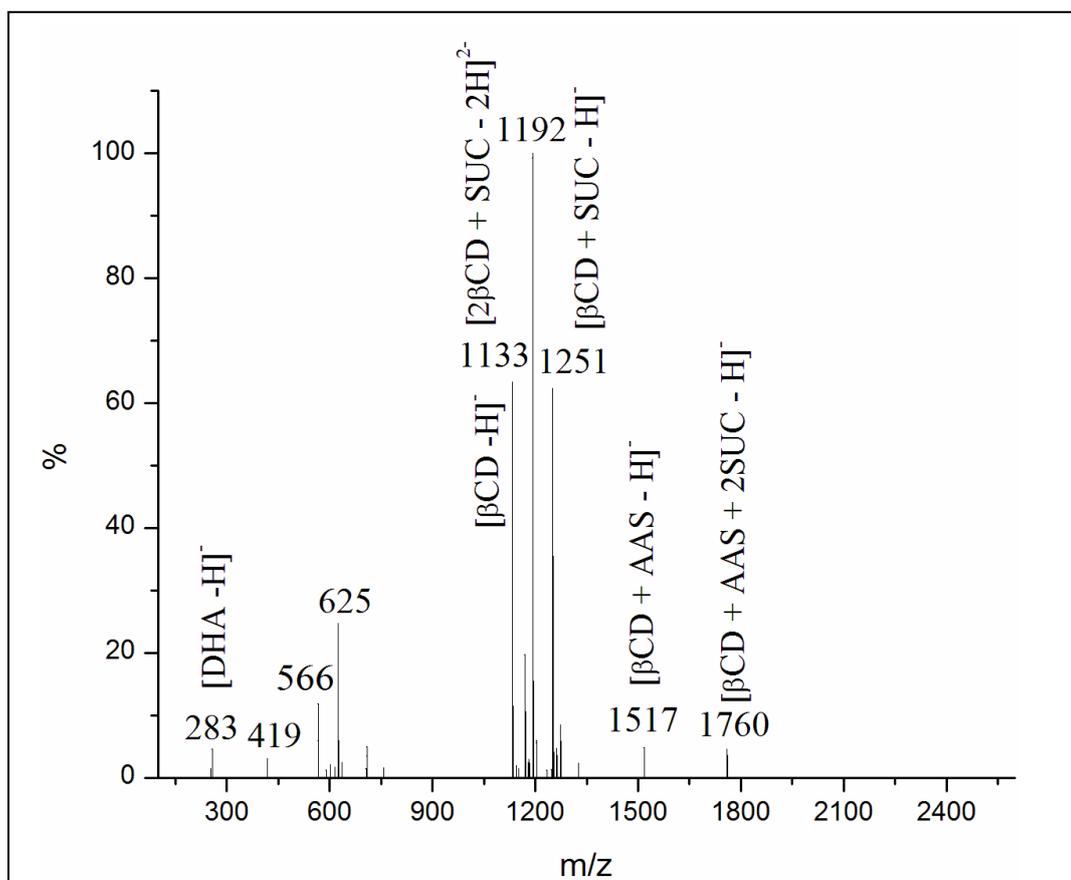
Alguns dos íons moleculares observados nos espectros de massa dos precursores livres, foram também observados no espectro de IES-EM dos compostos  $(\beta\text{CD}:\text{AS})1:1$  e  $(\beta\text{CD}:\text{AS})2:1$ , expostos nas Figuras 47 e 48, respectivamente, indicando que as moléculas livres estão em equilíbrio com seu compostos de inclusão em solução aquosa, tal como descrito para o sistema  $(\beta\text{CD}:\text{PNT})$ .



**Figura 47:** Espectro (IES (-)-EM) obtido para  $(\beta\text{CD}:\text{AS})1:1$ .

Além dos íons livres de AS e  $\beta$ CD, íons referentes aos compostos de inclusão também foram observados no espectro de IES-EM do composto  $(\beta\text{CD}:\text{AS})1:1$ . Merece destaque, o íon molecular com razão massa/carga 1326, o qual foi atribuído à forma desprotonada dupla carga do composto de inclusão na proporção molar 2:1, representado da seguinte forma:  $[\text{2}\beta\text{CD} + \text{AAS} - \text{2H}]^{2-}$ . Adicionalmente, observa-se o íon molecular com  $m/z$  equivalente a 1517, referente à forma desprotonada do composto de inclusão na proporção molar 1:1; ou seja;  $[\beta\text{CD} + \text{AAS} - \text{H}]^-$ , indicando que as espécies  $[\beta\text{CD} + \text{AAS} - \text{H}]^-$  e  $[\text{2}\beta\text{CD} + \text{AAS} - \text{2H}]^{2-}$ , coexistem em equilíbrio em solução.

Íons moleculares com  $m/z$  1192 e 1251 foram atribuídos aos compostos formados entre a molécula hospedeira com o ácido succínico, denominado SUC. Além disso, observa-se o íon molecular com  $m/z$  1760, referente à forma desprotonada do sistema supramolecular formado entre  $\beta$ CD, AAS e SUC, representado por  $[\beta\text{CD} + \text{AAS} + \text{2SUC} - \text{H}]^-$ .



**Figura 48:** Espectro (IES (-)-EM) obtido para  $(\beta\text{CD}:\text{AS})2:1$ .

No espectro IES-EM do composto ( $\beta$ CD:AS)<sub>2</sub>:1 (Figura 48), observa-se os íons moleculares com m/z 257, 419, 625, 1133, 1192, 1251, 1517 e 1760, todos observados no espectro de massa do composto ( $\beta$ CD:AS)<sub>1</sub>:1. Entretanto, não observa-se a presença do íon molecular com m/z 767, referente ao dímero de AS. Além disso, observa-se que a abundância relativa do íon com m/z 1133, referente à forma desprotonada da  $\beta$ CD, é maior em relação à abundância do referido íon no espectro do composto ( $\beta$ CD:AS)<sub>1</sub>:1. De modo análogo, a abundância relativa do íon com m/z 1517, referente à forma desprotonada do composto de inclusão ( $\beta$ CD:AS)<sub>1</sub>:1, é menor em relação ao espectro ( $\beta$ CD:AS)<sub>2</sub>:1. Tais experimentos indicam que o excesso de  $\beta$ CD no meio não favorece a formação do composto de inclusão na proporção molar 2:1.

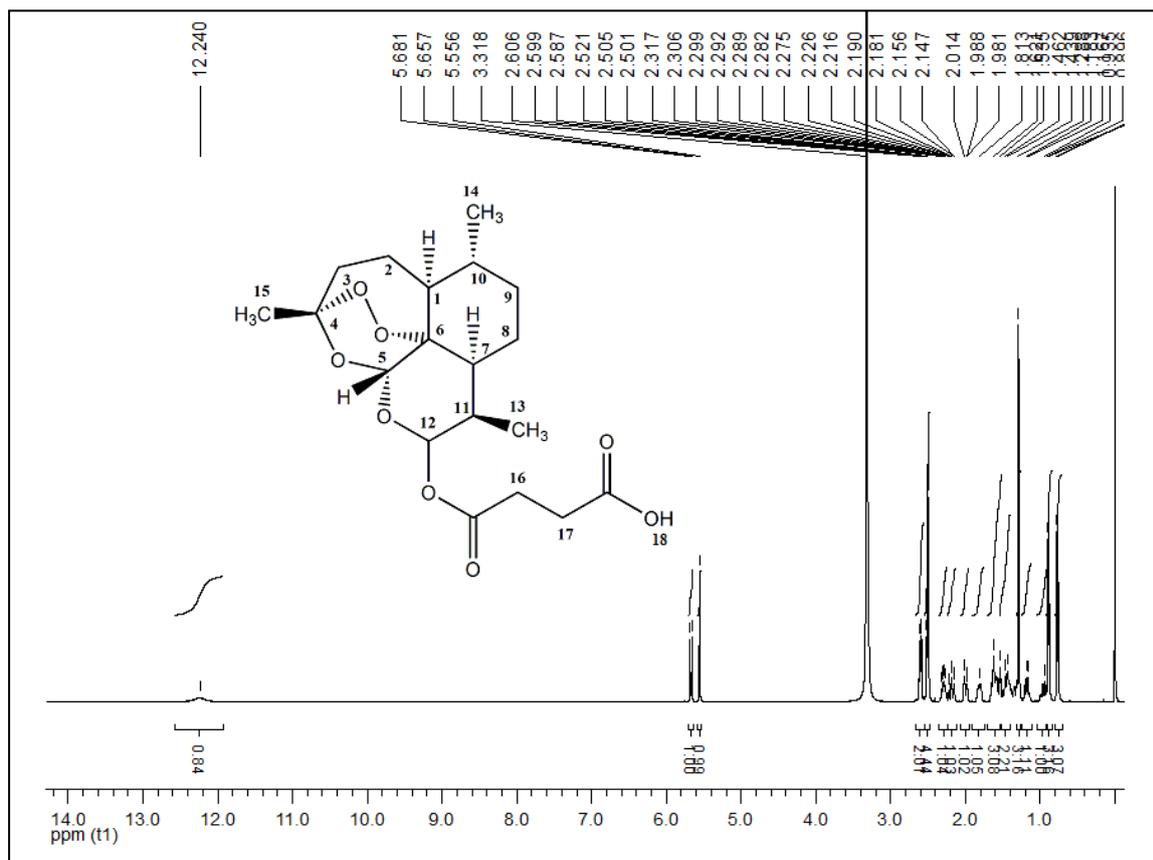
Através desta técnica foi possível constatar a formação de compostos de inclusão envolvendo o sistema  $\beta$ -ciclodextrina e Artesunato, os quais estão em equilíbrio em solução aquosa com as espécies supramoleculares formadas a partir de AS e  $\beta$ CD livres e com os produtos de hidrólise de AS (DHA e SUC).

A literatura documenta estudos envolvendo derivados de artemisinina e ciclodextrinas.(Ansari, Iqbal *et al.*, 2009; Yang, Lin *et al.*, 2009) Com o objetivo de aumentar a solubilidade e a estabilidade da diidroartemisinina (DHA), Ansari e colaboradores prepararam compostos de inclusão envolvendo a mesma e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ CD). (Ansari, Iqbal *et al.*, 2009) Os compostos foram caracterizados por diversas técnicas físico-químicas, além de serem estudados no âmbito da estabilidade térmica. Os estudos indicaram a formação do composto de inclusão HP- $\beta$ CD:DHA na proporção estequiométrica 1:1, o qual mostrou um aumento em torno de 40% da estabilidade térmica e uma diminuição significativa da taxa de hidrólise em relação à DHA livre. Outro estudo de relevância foi publicado em 2009 por Yang e colaboradores, (Yang, Lin *et al.*, 2009) o qual envolve a preparação de um composto de inclusão envolvendo arteméter e HP- $\beta$ CD.

#### 4.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Inicialmente, caracterizou-se por ressonância magnética nuclear o fármaco artesunato livre. A análise do espectro de <sup>1</sup>H para AS exposto na Figura 49, cuja expansão encontra-se representada na Figura 50, permitiu verificar a pureza do fármaco,

uma vez que a soma das integrais totalizam aproximadamente 28, sendo este o número de prótons da molécula em estudo.

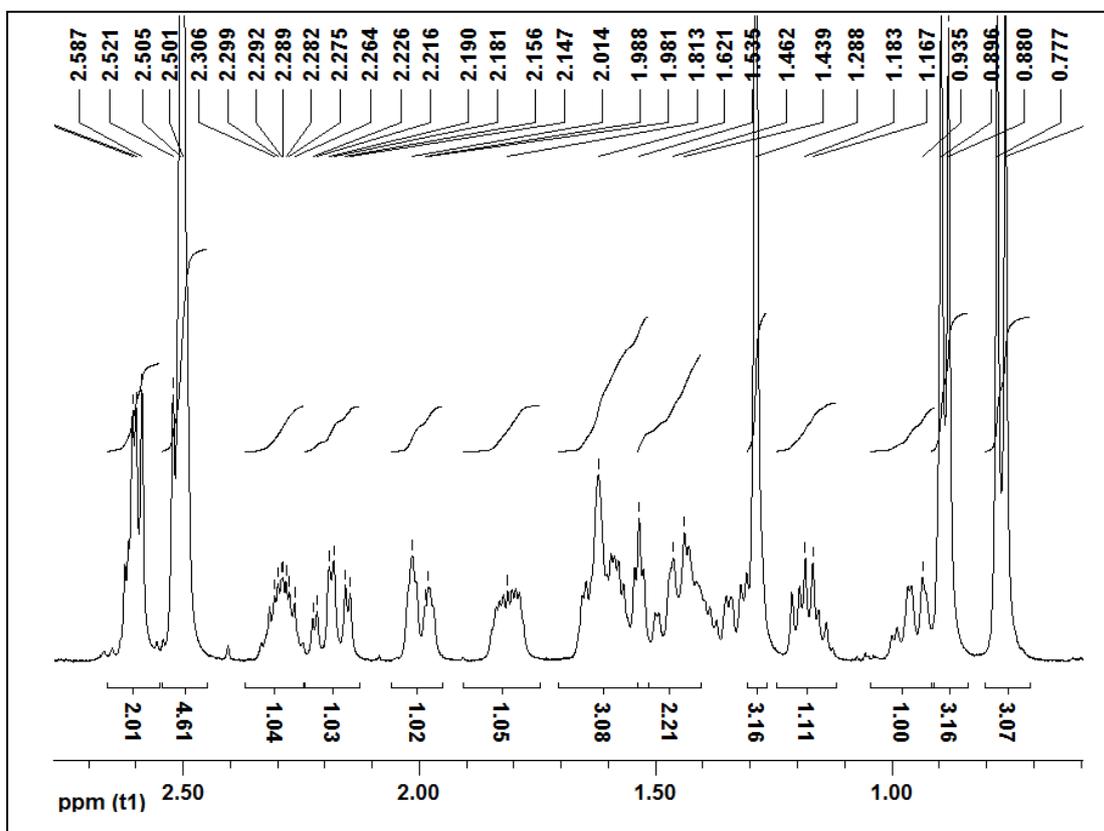


**Figura 49:** Espectro de RMN para o fármaco Artesunato (AS) obtido em DMSO- $d_6$ .

É importante ressaltar que para a molécula de interesse, a qual apresenta significativa sobreposição de sinais de RMN, o método utilizado para a atribuição dos sinais de ressonância foi o método de encadeamento. Nesse caso, partindo-se de um sinal com deslocamento químico conhecido, faz-se a conexão com os outros sinais de ressonância pertencentes aos hidrogênios e carbonos da molécula, por intermédio da análise dos espectros uni- e bidimensionais obtidos para o composto em estudo. Deste modo, partiu-se do hidrogênio denominado H12, o qual é observado como um duplete em aproximadamente 5,7 ppm, e do hidrogênio H5 do fármaco observado como um singlete em aproximadamente 5,6, como descrito na literatura. (Nyadong, Harris *et al.*, 2009; Martino, Malet-Martino *et al.*, 2010) O hidrogênio do grupamento ácido da molécula pode ser visualizado através de um sinal em 12,2 ppm, sendo este o mais desblindado do referido fármaco. (Silverstein, Webster *et al.*, 2005)

Na região do espectro de 1,2 a 2,2 ppm, são observados diversos sinais referentes à hidrogênios alifáticos do artesunato, mas devido à complexidade da

molécula estudada, a atribuição completa de tais sinais foi realizada com o auxílio dos experimentos DEPT-135, HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  e COSY.

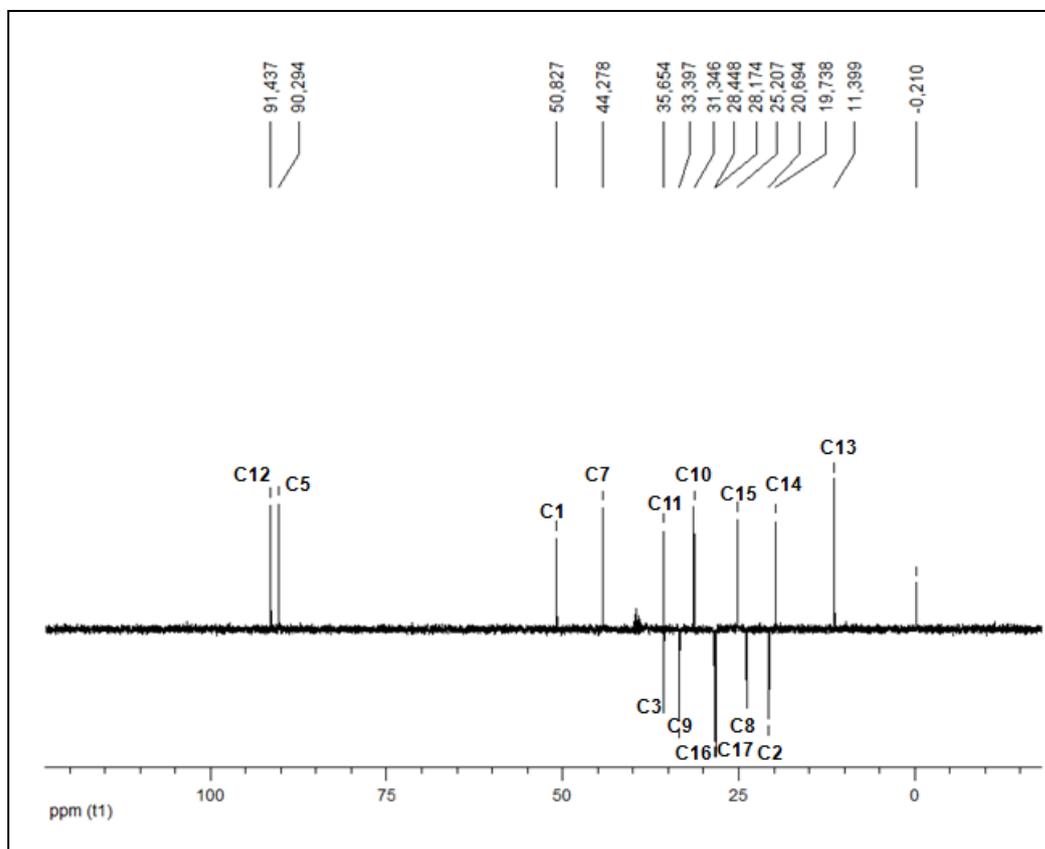


**Figura 50:** Expansão do espectro de RMN para o fármaco AS obtido em DMSO- $d_6$  na região de 0,70 a 2,90 ppm.

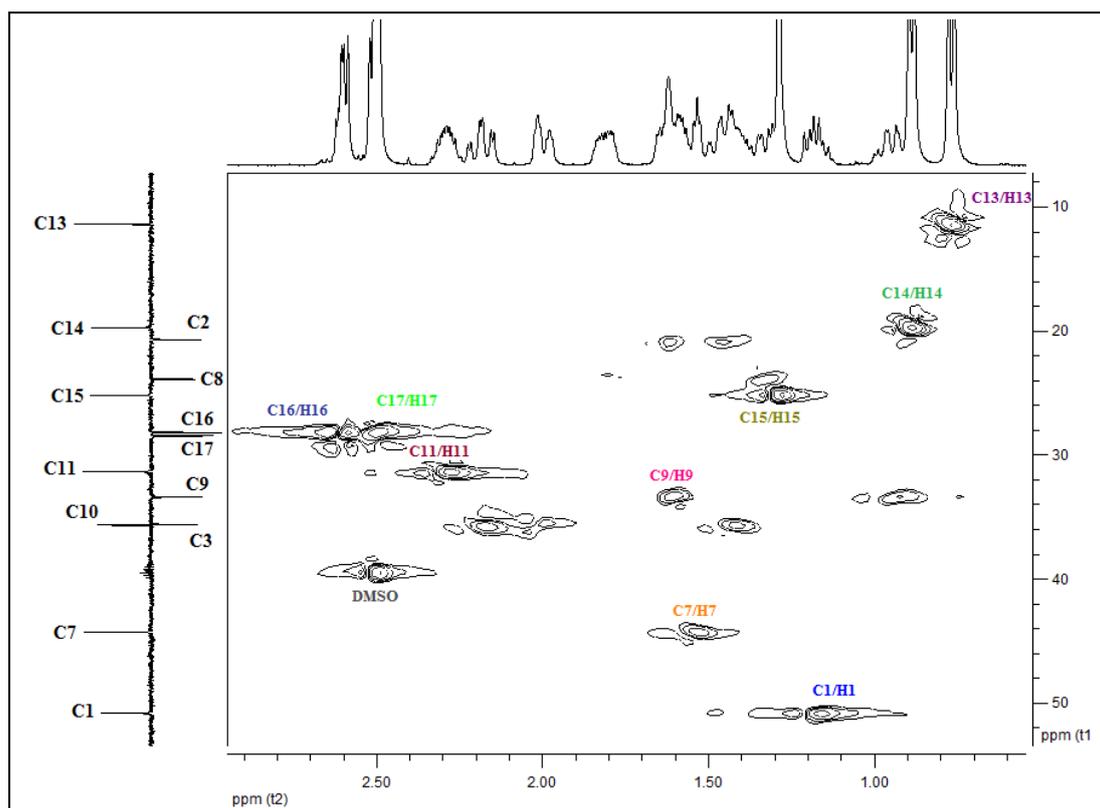
Os sinais referentes aos hidrogênios metílicos denominados H13, H14 e H15 são observados em aproximadamente 0,8; 0,9 e 1,3 ppm, respectivamente, os quais são visualizados claramente na Figura 50. Os hidrogênios H16 e H17 da cadeia lateral são os mais desblindados ilustrados na Figura 50, os quais equivalem aos multipletos em 2,61 e 2,51, respectivamente, sendo que o sinal referente a H17 está sobreposto ao sinal do solvente DMSO.

Analisando o espectro de  $^{13}\text{C}$ -DEPT-135 exposto na Figura 51, foi possível determinar a posição dos carbonos 1-3, 5, 7-17. Deste modo, a partir do mapa de contorno HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -DEPT 135, exposto na Figura 52, os valores de deslocamentos químicos para os hidrogênios H1, H7, H9 e H11, puderam ser determinados através das correlações heteronucleares presentes, como especificado na Tabela 5. Por outro lado, a supracitada técnica deixou dúvida a respeito dos deslocamentos químicos dos

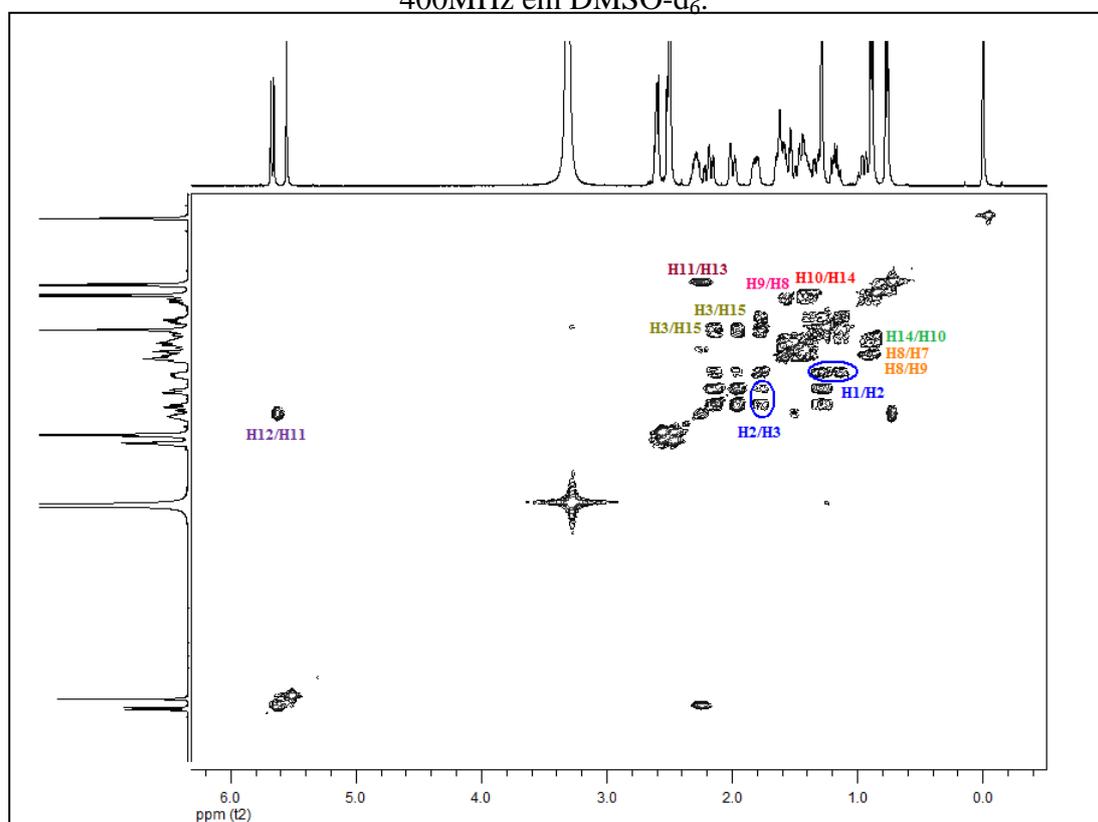
hidrogênios H2, H3, H8 e H10. Assim, o experimento decisivo para determinar tais deslocamentos químicos foi o mapa de contorno COSY, cuja figura encontra-se representada na Figura 53.



**Figura 51:** RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 para AS a 400MHz em  $\text{DMSO } d_6$ .



**Figura 52:** Expansão do mapa de contorno HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -DEPT 135 para o AS a 400MHz em DMSO- $d_6$ .



**Figura 53:** Expansão do mapa de contorno COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  para AS a 400MHz em DMSO- $d_6$ .

**Tabela 5:** Atribuição, número de hidrogênios (N°), multiplicidade(\*) e deslocamento químico ( $\delta$ ) dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  do fármaco AS livre (400 Hz, DMSO- $d_6$ ).

Atribuição	N°	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
		AS
H1	1	1,18 (m)
H2	2	1,80 (m)
H3	3 {a e b}	a: 2,18 (m) b: 2,00 (m)
H5	1	5,57 (s)
H7	1	1,54 (m)
H8	2	0,95 (m)
H9	2	1,62 (m)
H10	1	1,44 (m)
H11	1	2,29 (m)
H12	1	5,67 (d)
H13	3	0,77(d)
H14	3	0,89 (d)
H15	3	1,29 (s)
H16	2	2,60 (m)
H17	2	2,51 (m)
H18	1	12,24 (s)

\*Informações sobre multiplicidade se encontram entre parêntesis. s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; dd = duplo duplete; m = multiplete.

Como pode ser observado a partir desta análise, o sinal em aproximadamente 1,80 ppm correlaciona com o hidrogênio H1, logo equivale ao H2. Já os sinais observados em aproximadamente 2,2 e 2,0 ppm, correlacionam com os hidrogênios H1

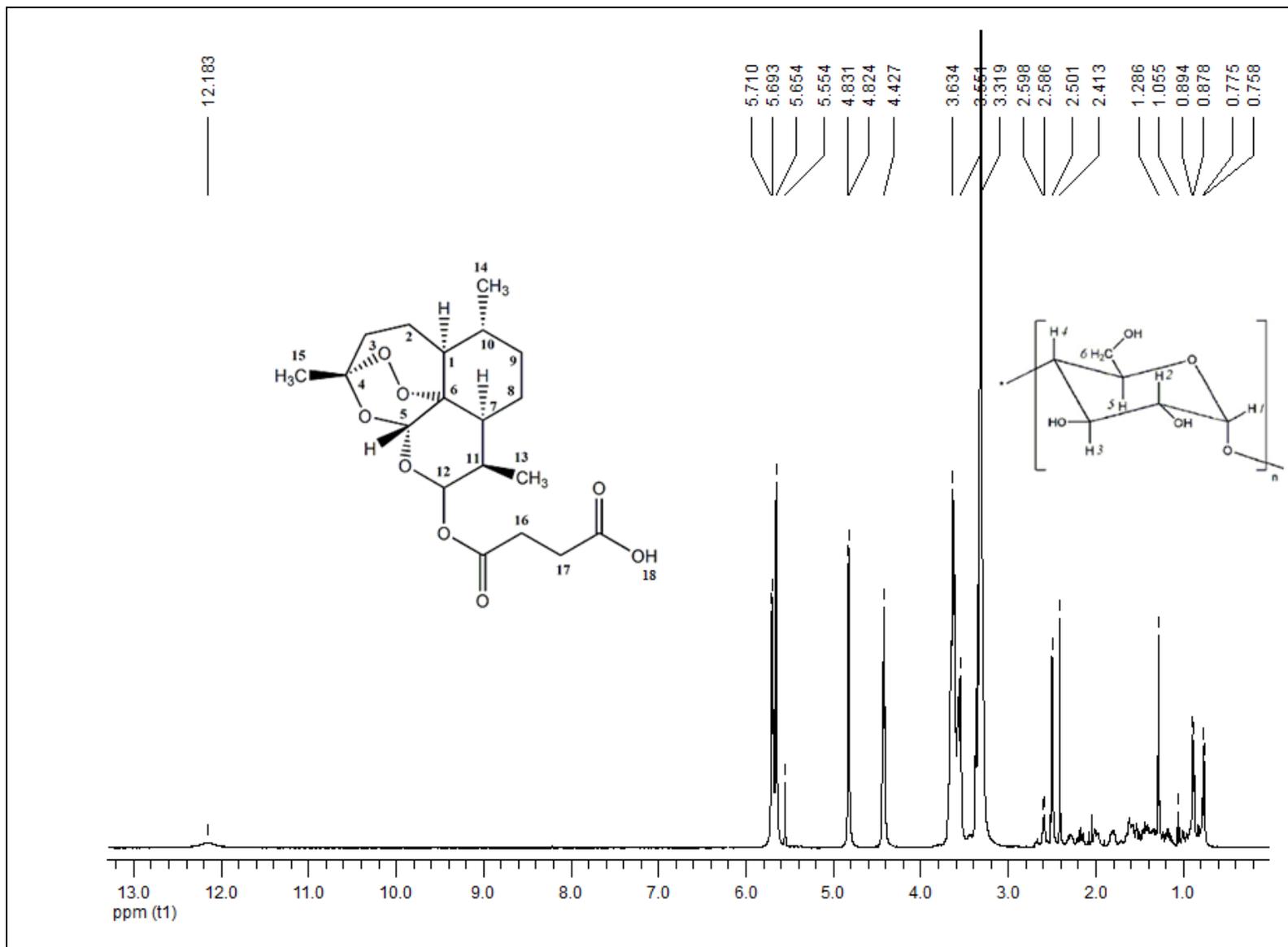
e H2, sendo atribuído ao hidrogênios denominados H3, os quais aparecem desdobrados e com manchas de correlação entre si no COSY.

O sinal observado em 0,95 ppm apresenta manchas de correlação com aqueles observados em 1,54 e 1,62 ppm, referentes ao H7 e H9, respectivamente, desta forma, o mesmo foi atribuído ao H8. Adicionalmente, o sinal em 1,44 ppm apresenta mancha de correlação com o H14, sendo atribuído ao H10. Por fim, outras correlações podem ser observadas no espectro COSY exposto na Figura 53, confirmando as atribuições feitas previamente. A análise dos dados dos experimentos bidimensionais possibilitou a atribuição inequívoca e completa de todos os sinais da molécula de AS, a qual constitui uma lacuna na literatura.

Adicionalmente, estudos de ressonância magnética nuclear foram realizados para o sistema supramolecular formado entre o fármaco AS e  $\beta$ CD. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1, envolvendo  $\beta$ CD e AS em diferentes proporções molares, foram obtidos em DMSO- $d_6$ . A Figura 54 exibe o espectro de RMN para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1.

Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  dos compostos de inclusão ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\beta$ CD:AS)2:1, bem como a variação dos deslocamentos químicos ( $\Delta\delta = \delta\text{AS} - \delta\beta\text{CD:AS}$ ) são resumidos na Tabela 6.

Alterações sutis nos deslocamentos químicos de hidrogênios do AS foram observadas quando o referido fármaco está em presença de  $\beta$ CD, quando comparado com os deslocamento de  $^1\text{H}$  do fármaco livre. (Nyadong, Harris *et al.*, 2009) No composto ( $\beta$ CD:AS)1:1, as variações de deslocamento químico mais significativas ocorreram para os hidrogênios H16, H17 e H18 da cadeia terminal do fármaco. Por outro lado, no sistema ( $\beta$ CD:AS)2:1 as variações de deslocamento químico foram expressivas para um número maior de hidrogênios, sendo os mais afetados aqueles denominados H5, H10, H16 e H17, sugerindo a inclusão na cavidade da  $\beta$ CD pela parte do fármaco na qual tais hidrogênios estão diretamente ligados.

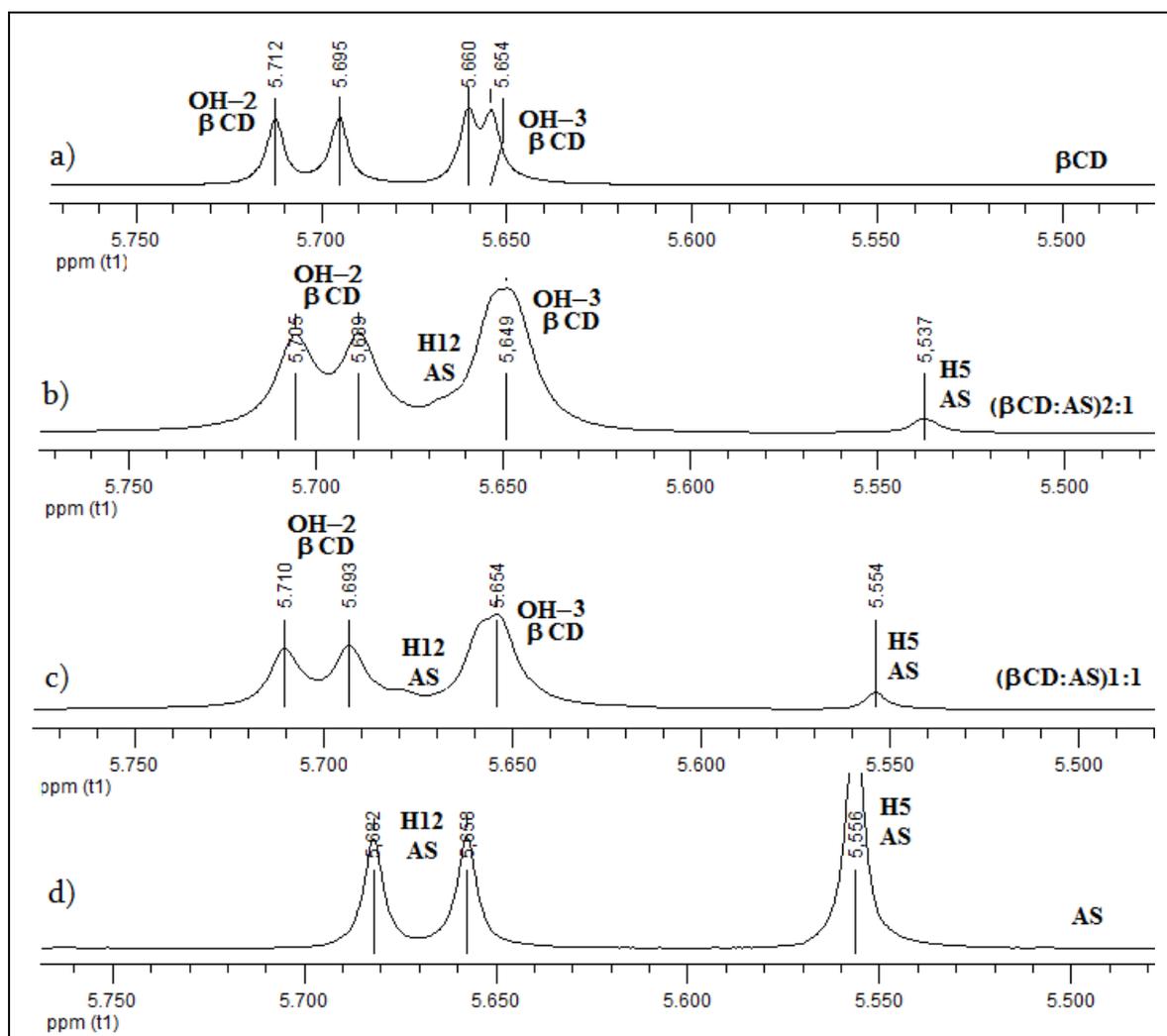


**Figura 54:** Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  para o composto  $(\beta\text{CD:AS})_{1:1}$  em  $\text{DMSO-d}_6$ .

**Tabela 6:** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (em 400MHz) de prótons do Artesunato no fármaco livre e na presença de  $\beta\text{CD}$ , usando  $\text{DMSO-d}_6$  e valores  $\Delta\delta$ .

Próton	$\delta$ AS	$\delta$ ( $\beta\text{CD:AS}$ )1:1	$\Delta\delta$ ( $\beta\text{CD:AS}$ )1:1	$\delta$ ( $\beta\text{CD:AS}$ )2:1	$\Delta\delta$ ( $\beta\text{CD:AS}$ )2:1
H1	1,18	1,18	0,001	1,17	0,011
H2	1,80	1,81	0,004	1,80	0,001
H3	a: 2,18 b: 2,00	a: 2,18 b: 1,99	a:0,003 b: 0,009	a: 2,17 b:2,00	a: 0,008 b: 0,004
H5	5,56	5,55	0,002	5,54	0,019
H7	1,54	1,53	0,002	1,52	0,013
H8	0,95	0,95	0,004	0,95	0,007
H9	1,62	1,62	0,005	1,61	0,013
H10	1,44	1,44	0,003	1,42	0,020
H11	2,29	2,29	0,001	2,28	0,009
H12	5,67	-	-	-	-
H13	0,77	0,77	0,002	0,76	0,013
H14	0,89	0,89	0,003	0,88	0,014
H15	1,29	1,28	0,009	1,28	0,014
H16	2,61	2,60	0,011	2,59	0,022
H17	2,51	2,41	0,101	2,40	0,118
H18	12,24	12,183	0,057	-	-

Curiosamente, para o sistema em estudo, os sinais referentes aos hidrogênios H5 e H12 do fármaco AS livre são observados na mesma região dos sinais atribuídos aos hidrogênios de OH-2 e OH-3 da  $\beta\text{CD}$ , uma vez que os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em  $\text{DMSO-d}_6$ , como pode ser claramente visualizado na expansão ilustrada na Figura 55. O duplete referente ao hidrogênio denominado H12, se sobrepõe ao sinal atribuído ao hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 3 da  $\beta\text{CD}$ , dificultando deste modo, a análise do deslocamento químico deste sinal.

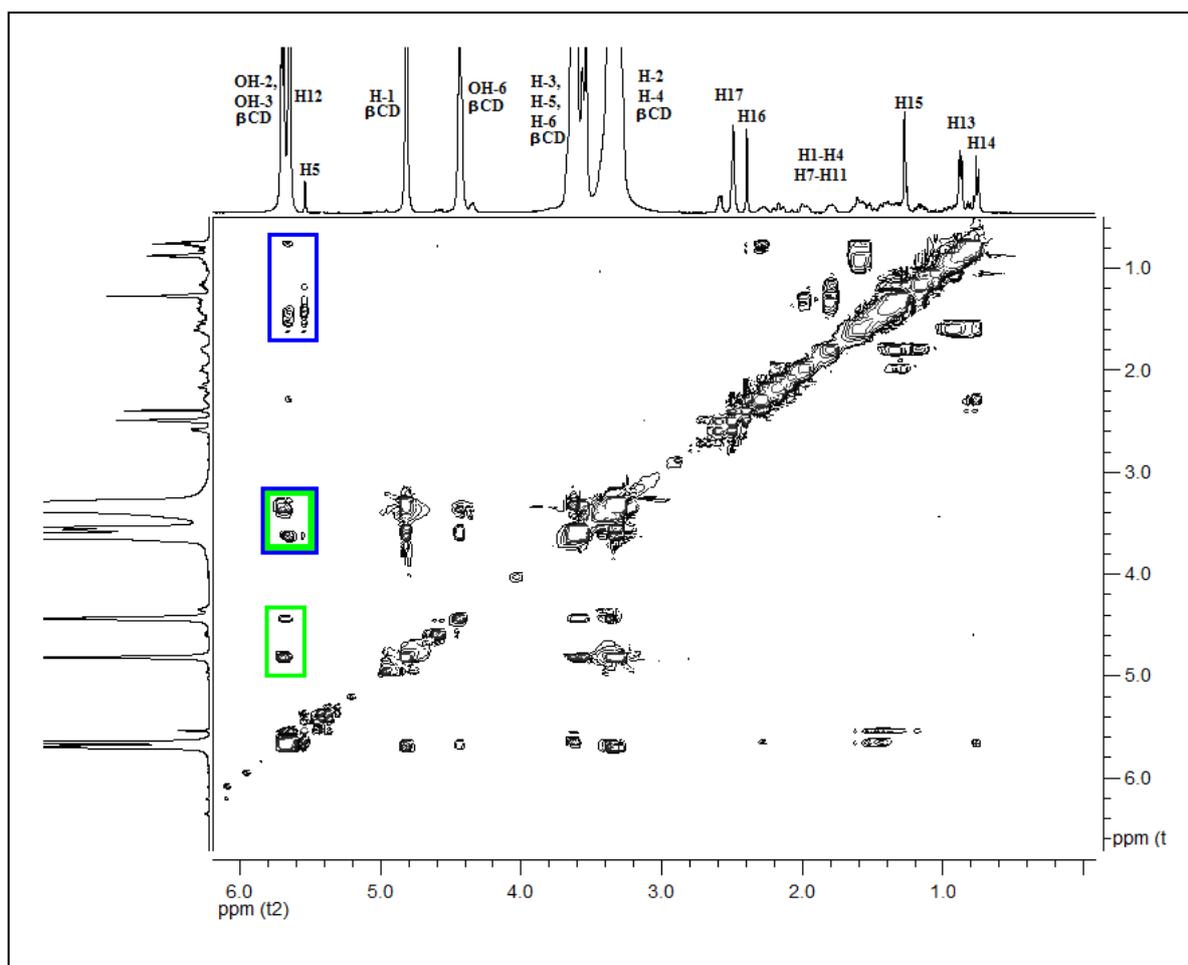


**Figura 55:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) na região de 5.53-5.76 ppm: a)  $\beta$ -ciclodextrina, b) composto ( $\beta\text{CD}:\text{AS}$ )2:1, c) composto ( $\beta\text{CD}:\text{AS}$ )1:1 e d) Artesunato.

Um experimento 2D ROESY foi realizado para a amostra ( $\beta\text{CD}:\text{AS}$ )1:1, como ilustrado na Figura 56, buscando observar interações dipolares entre hóspede e hospedeiro e investigar sobre a presença do composto de inclusão. No referido mapa de contorno, chama a atenção as manchas de correlação destacadas, uma vez que as mesmas ocorrem na região de sobreposição dos sinais da  $\beta\text{CD}$  com o sinal atribuído ao hidrogênio denominado H12 de AS.

Como pode ser observado, a correlação demarcada por azul indica correlações entre os hidrogênios H5 e H12 de AS, com hidrogênios mais blindados do supracitado fármaco. Por outro lado, a área com realce verde, indica correlações entre hidrogênios da molécula hospedeira  $\beta\text{CD}$ . Entretanto, as manchas de correlação observadas na área

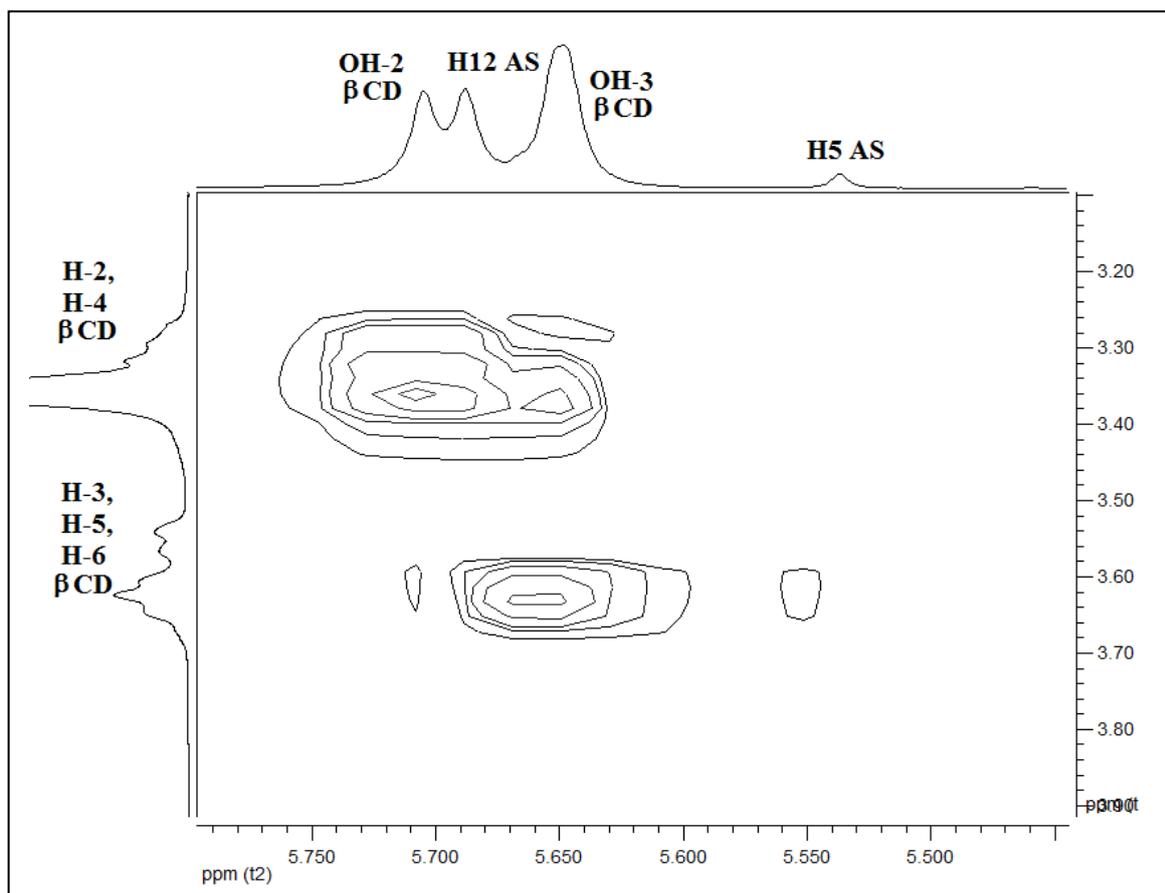
delimitada por azul e verde, são de difícil atribuição, uma vez que podem ser apenas devido à correlações entre hidrogênios da  $\beta$ CD como também podem estar relacionadas à correlação de H12 de AS com os hidrogênios da macromolécula (H-3 e H-5 internos e H-2 e H-4 externos). A Figura 57 mostra a expansão da região destacada por verde e azul, do mapa de contorno 2D ROESY.



**Figura 56:** Ressonância Magnética Nuclear 2D ROESY para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1, obtido em DMSO  $d_6$  400MHz.

É importante mencionar que outros dados de RMN, como o valor dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de AS na presença de  $\beta$ CD expostos na Tabela 6, apresentaram alterações praticamente desprezíveis com relação à resolução do equipamento. Tal observação é um indicativo de que provavelmente a dissolução de AS em DMSO- $d_6$  provocou a quebra da interação entre AS e a molécula hospedeira  $\beta$ CD, visto que os resultados obtidos a partir das caracterizações no estado sólido, sobretudo espectroscopia vibracional na região do infravermelho e análise térmica, bem como os

experimentos de espectrometria de massa (ESI-MS), indicaram a existência do composto de inclusão envolvendo  $\beta$ CD e AS, tanto no estado sólido quanto em solução.

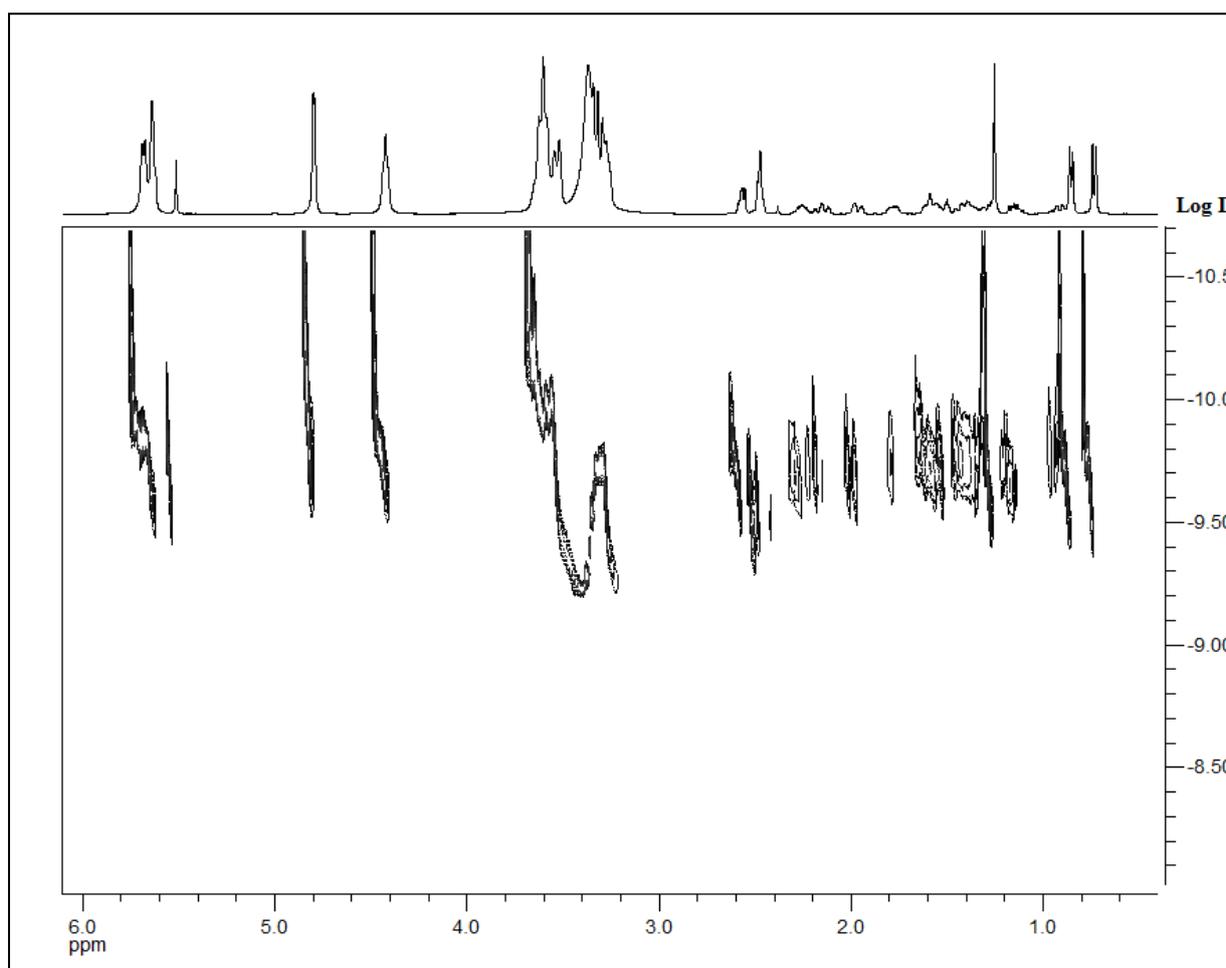


**Figura 57:** Expansão do mapa de contorno 2D ROESY para o composto ( $\beta$ CD:AS)1:1, na região de 5,5-5,8 ppm.

Em suma, o mapa de contornos apresentado na Figura 56, não mostra correlações indicativas de nOe entre os sinais de ressonância da molécula de AS e  $\beta$ CD, levando à suposição de que o composto de inclusão não permanece ligado em solução de DMSO- $d_6$ , como mencionado anteriormente, provavelmente devido a uma interação muito fraca entre as moléculas hóspede e hospedeira. Deste modo, com o intuito de investigar a presença ou não de interações entre o supracitado fármaco e  $\beta$ CD, recorreu-se à técnica DOSY, a qual pode ser aplicada como ferramenta complementar para a caracterização de sistemas supramoleculares envolvendo ciclodextrinas, como amplamente reportado na literatura. (Uccello-Barretta, Balzano *et al.*, 2005; Jullian, Miranda *et al.*, 2007; Lula, Denadai *et al.*, 2007; De Sousa, Denadai, Lula, Nascimento *et al.*, 2008)

Os coeficientes de difusão foram obtidos pelo processamento dos experimentos utilizando o software DOSY do espectrômetro de RMN, em DMSO- $d_6$ . O software produz um espectro bidimensional onde os deslocamentos químicos são apresentados no eixo F2 e os valores das constantes de difusão ou  $\log D(m^2/s)$ , no eixo F1.

A Figura 58, mostra o mapa de contorno DOSY obtidos para o sistema ( $\beta$ CD:AS)1:1 em DMSO- $d_6$ .



**Figura 58:** Espectro de RMN de difusão para o sistema ( $\beta$ CD:AS)1:1, a 400 MHz em DMSO- $d_6$ .

Através do referido experimento, é possível verificar que tanto o fármaco AS, quanto a molécula hospedeira  $\beta$ CD, apresentam o mesmo coeficiente de difusão, cujo valor é aproximadamente  $9,75 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . É importante relatar que espera-se para ambas moléculas,  $\beta$ CD e AS, mobilidades diferentes em solução, devido à diferença de massa molar dos dois compostos. (Fraceto, Goncalves *et al.*, 2007)

Neste contexto, o valor do coeficiente de difusão observado, está associado com o peso molecular do sistema em solução e pode ser comparado ao descrito na

literatura (Guerrero-Martinez, Gonzalez-Gaitano *et al.*, 2006) para a  $\beta$ CD livre, o qual é  $D \approx 6,7 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . A referida comparação, indica que o sistema supramolecular envolvendo  $\beta$ CD e AS, apresenta maior peso molecular em relação à macromolécula livre e conseqüentemente, evidencia a existência de algum tipo de interação entre as moléculas em solução. Esse resultado corrobora com aqueles obtidos pela técnica ESI-MS e exibe um comportamento similar ao observado para outros sistemas descritos na literatura.(Guerrero-Martinez, Palafox *et al.*, 2006; De Sousa, Denadai, Lula, Nascimento *et al.*, 2008)

#### 4.6. ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE AS POR ELETROFORESE CAPILAR

Estudos envolvendo a técnica analítica eletroforese capilar foram realizados para o sistema formado entre  $\beta$ -ciclodextrina e artesunato com o intuito de avaliar a solubilidade do referido fármaco na presença de  $\beta$ CD.

É importante mencionar que uma barreira para o desenvolvimento de fármacos combinados a base de artemisinina, para tratamento da malária, é a falta de especificações para o teste de pureza da artemisinina. Um método para avaliar a pureza de artemisinina por HPLC foi publicado na farmacopeia International, sendo o mesmo caracterizado pela precisão, linearidade e robustez. (Stringham, Lynam *et al.*, 2009). O mesmo problema é verificado para seus derivados.

A literatura documenta alguns métodos analíticos para detecção de AS, incluindo método colorimétrico, (Green, Mount *et al.*, 2000), refratometria (Green, Nettey *et al.*, 2007) eletroforese capilar de zona, (Gabriels, Jimidar *et al.*, 1999) LC-MS (Naik, Murry *et al.*, 2005; Lindegardh, Dondorp *et al.*, 2007) e métodos cromatográficos bioanalíticos (Batty, Davis *et al.*, 1996) para quantificação de AS. Em especial, testes colorimétricos tem sido desenvolvidos para determinar a autenticidade de derivados de artemisinina, os quais não apresentam grupamentos químicos específicos para reagir com determinados reagentes formando produtos coloridos. Assim, os mesmos podem ser transformados por ácidos ou bases para formar enolatos/carboxilatos ou decalonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, que são compostos mais reativos. (Thomas, Ward *et al.*, 1992) Como exemplo, um sal de diazônio reage com o produto de decomposição de artesunato em meio básico, levando ao surgimento de uma coloração amarela em pH 4. (Martino, Malet-Martino *et al.*, 2010)

É amplamente descrito na literatura que o método mais acessível para avaliar a qualidade de derivados de artemisinina como AS é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV. (Cesar, Nogueira *et al.*, 2008; Stringham, Lynam *et al.*, 2009; Martino, Malet-Martino *et al.*, 2010; Ranher, Gandhi *et al.*, 2010; Diawara, Gbaguidi *et al.*, 2011). Por outro lado, o método mais eficiente é HPLC com detecção por espectrômetro de massa, mas este requer conhecimento especializado em termos de investimento e serviço. (Messori, Piccioli *et al.*, 2003). Em particular, para o controle de qualidade de AS em formulações farmacêuticas, um simples, robusto e rápido método em HPLC com detecção direta por UV em 220 nm é realizado, o qual permite separar AS e DHA em 3 minutos. (Phadke, Jadhav *et al.*, 2008; Gaudin, Kauss *et al.*, 2009)

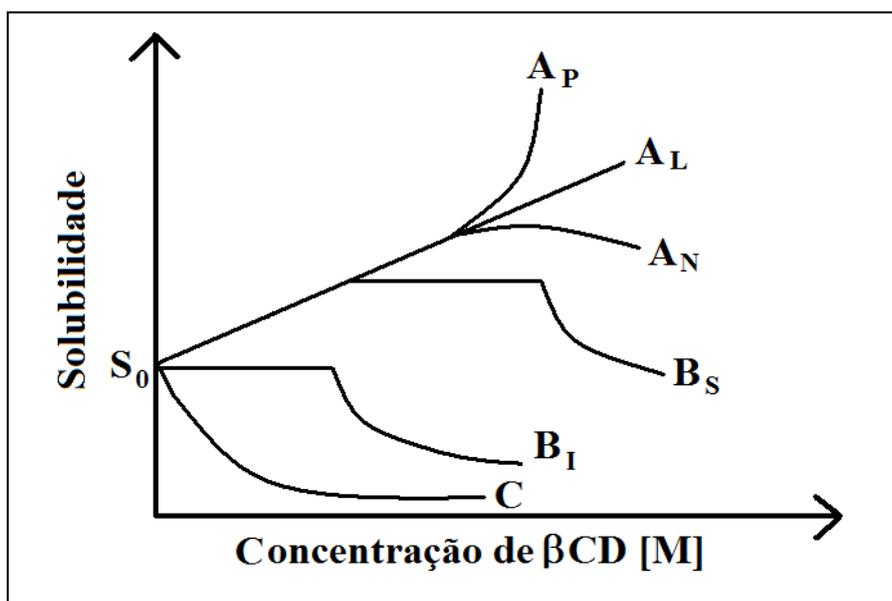
Por sua vez, a eletroforese capilar (CE, Capillary Electrophoresis) tem recebido especial atenção para análise de macromoléculas biológicas e para separação de aminoácidos, fármacos, vitaminas, pesticidas, íons inorgânicos, peptídeos e carboidratos. (Tavares, 1997; Blessum, Jeppsson *et al.*, 1999; Ostergaard e Heegaard, 2003) Algumas das principais características da CE são alta eficiência, tempo curto de análise, utilização de volumes bastante reduzidos de amostra, reduzido custo de operação, simplicidade na instrumentação e diversidade de aplicações. (Wu, Zhou *et al.*, 2004). Alguns estudos reportam a utilização da referida técnica para análise de artesunato. (Dhulst, Augustijns *et al.*, 1996; Gabriels, Jimidar *et al.*, 1999) Em especial, Gabriels e colaboradores (Gabriels, Jimidar *et al.*, 1999) utilizaram CE para detecção e separação de artesunato e ácido artelínico.

Como mencionado na seção 2.2.4. do capítulo 2, os experimentos de EC foram realizados utilizando-se como eletrólito um tampão ftalato/tris (ácido ftálico 10mM + tris(hidroximetil)aminometano 40mM) em pH 8,0, já que nessa faixa de pH o fármaco de interesse AS, cujo  $pK_a$  é equivalente a 4,6, encontra-se desprotonado, (Augustijns, Dhulst *et al.*, 1996) podendo ser facilmente identificado no modo contrafluxo. Por outro lado, um dos produtos de hidrólise do supracitado fármaco, a DHA apresenta  $pK_a$  equivalente a 12,6 (<http://www.authorstream.com/Presentation/aakrutisanjeev-537640-dihydroartemisinin/> acesso em 13 de fevereiro de 2013) e sairia no eletroferograma junto ao fluxo, uma vez que estaria neutra em pH 8,0, não interferindo a análise. As análises foram realizadas com a adição de padrão interno em todas as amostras, para que qualquer pico de sistema fosse corrigido.

O método Higuchi (Higuchi e Connors, 1965) é geralmente aplicado a fármacos passíveis de serem quantificados pela técnica UV. Entretanto, como AS absorve pouco

na região do UV e ainda apresenta baixa solubilidade em H<sub>2</sub>O, a referida técnica não é a mais adequada como mencionado anteriormente. Pelo mesmo motivo, a preparação de uma curva de calibração em H<sub>2</sub>O para quantificação é inviável, logo a concentração de AS nos analitos não pôde ser determinada por CE, podendo entretanto, ser correlacionada com a área do pico no eletroferograma.

De acordo com o supracitado método, após a quantificação do fármaco obtém-se um gráfico da solubilidade do mesmo em função da concentração molar de ciclodextrina. A curva obtida pode apresentar dois formatos diferenciados, que são denominados tipo A e tipo B, como ilustrado na Figura 59.

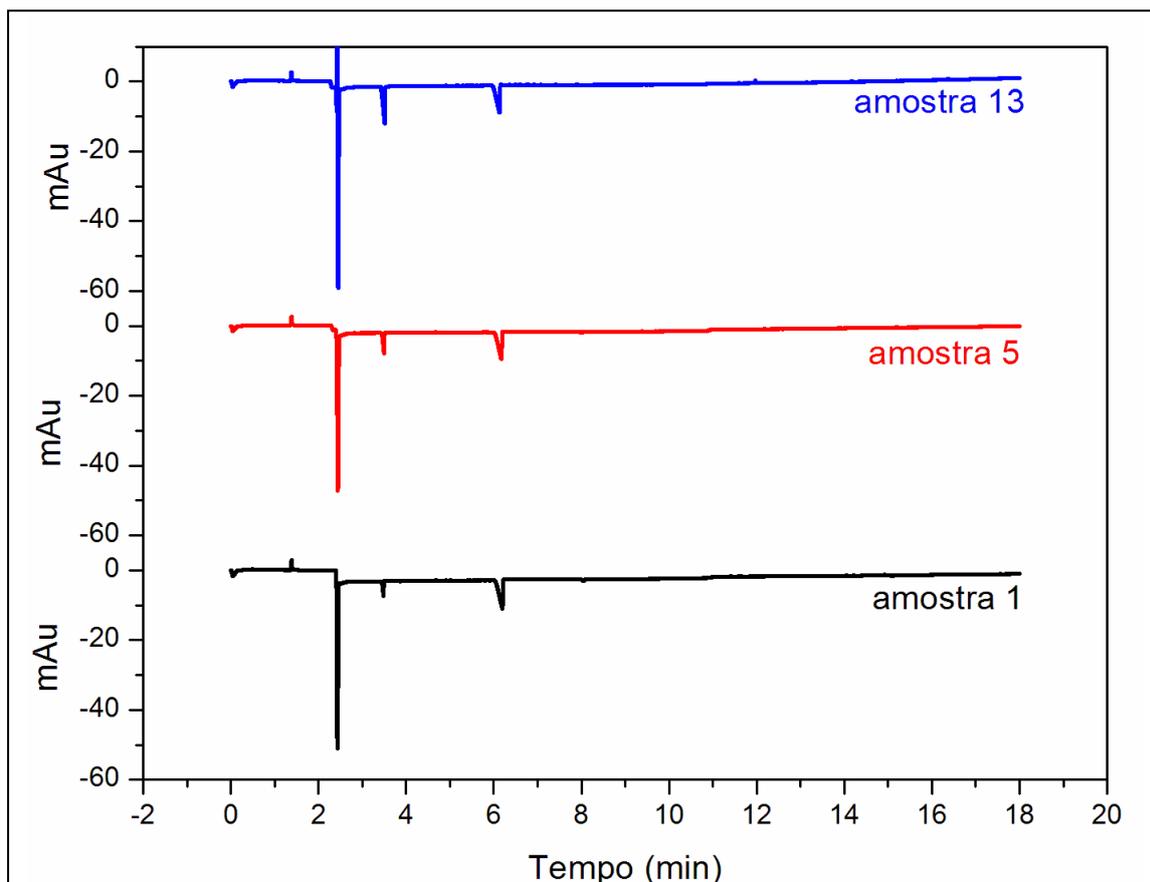


**Figura 59:** Diagramas de solubilidade obtido por Higuchi e Connors. (Higuchi e Connors, 1965)

A curva A representa um sistema onde ocorre a formação de um complexo de inclusão solúvel em água e apresenta uma relação linear entre as concentrações de ciclodextrina e do fármaco. Tal curva é denominada mais especificamente de A<sub>L</sub> e os pequenos desvios são classificados como desvios positivo (A<sub>P</sub>) e negativo (A<sub>N</sub>). Por outro lado, no sistema representado pela curva B ocorre a formação de um complexo com solubilidade limitada, denominado sistema B<sub>S</sub>, ou um composto insolúvel, denominado B<sub>I</sub>.

Após a realização de todas as corridas, os eletroferogramas obtidos para as amostras 1, 5 e 13, estão expostos na Figura 60. Como pode, o fármaco de interesse AS, sai em aproximadamente 3,5 minutos e o padrão interno lactato de sódio em 6 minutos,

nestas condições, tal como reportado na literatura. (Gabriels, Jimidar *et al.*, 1999) Observa-se que o pico referente ao fármaco em estudo, apresentou maior área com o aumento da concentração de  $\beta$ CD. Todos os picos referentes a AS e ao padrão interno, tiveram sua área integrada, sendo determinada posteriormente a área corrigida do pico de AS. A área corrigida foi determinada dividindo-se a área do pico referente ao fármaco pela área do pico do padrão interno, de cada eletroferograma.



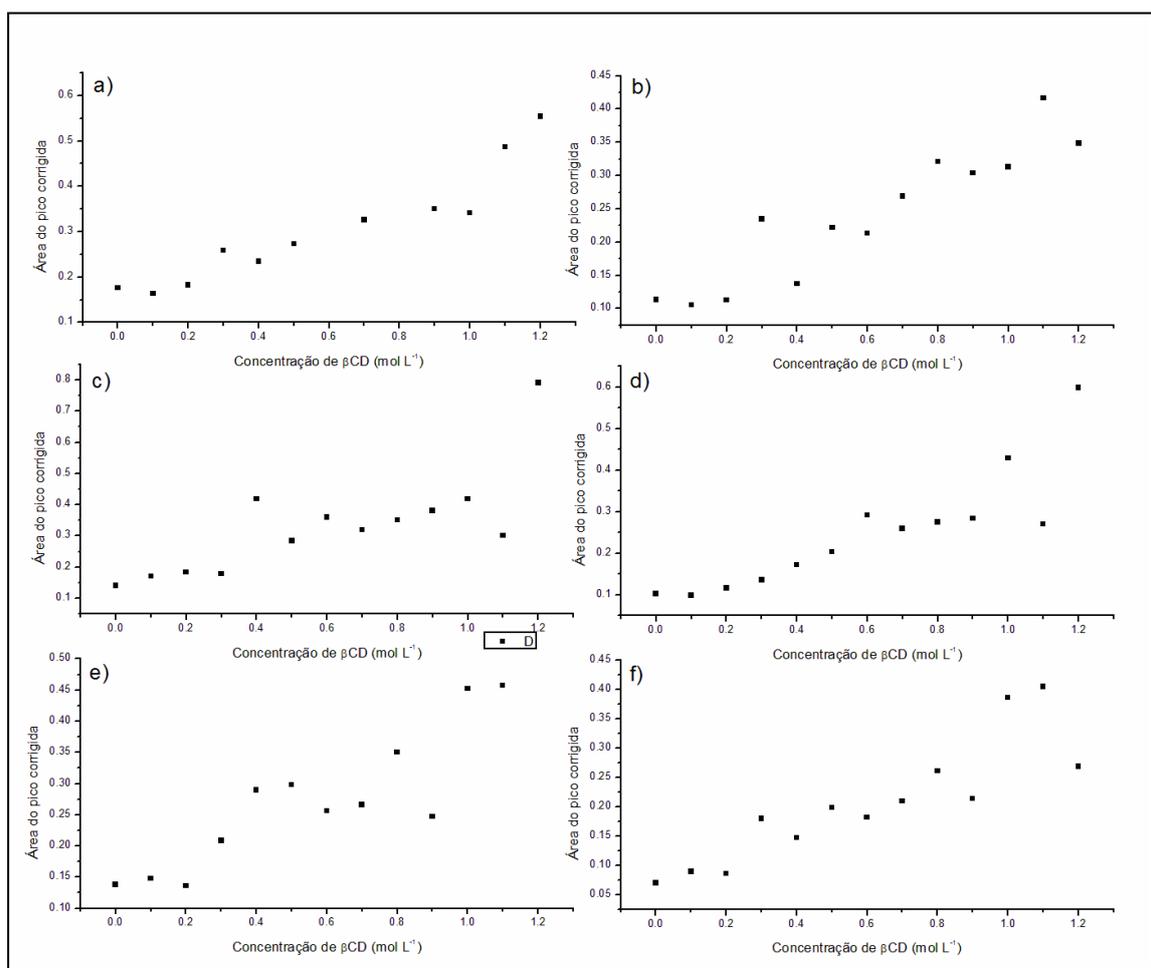
**Figura 60:** Eletroferogramas obtidos para as amostras 1, 5 e 13.

A área do pico foi correlacionada à quantidade de AS disponível em solução aquosa, com isso, plotou-se em um gráfico a área corrigida de AS para cada uma das amostras em função da concentração de  $\beta$ CD. Deste modo, na Figura 61, estão expostos os gráficos obtidos a partir da área corrigida do pico de AS para as amostras de 1 a 13, de 1' a 13' e de 1'' a 13'', bem como para suas réplicas, podendo ser observado um perfil similar entre os mesmos.

Sabe-se que quanto maior a área do pico, maior a concentração do fármaco em solução aquosa e conseqüentemente, maior é a solubilidade do AS, uma vez que todas

as amostras apresentam a mesma massa do fármaco, variando apenas na concentração da molécula hospedeira. Assim, o estudo por eletroforese capilar para o sistema  $\beta$ CD:AS indicou que a solubilidade do referido fármaco aumenta com o aumento da concentração de  $\beta$ CD.

Em analogia ao método proposto por Higuchi (Higuchi e Connors, 1965) descrito anteriormente, o diagrama pode ser classificado como  $A_L$ , conforme Figura 59, sendo relacionado com a formação de um composto de inclusão solúvel. Esse mesmo comportamento foi observado para o composto de inclusão obtido entre Arteméter e HP- $\beta$ CD (Yang, Lin *et al.*, 2009) e para DHA e HP- $\beta$ CD, (Ansari, Iqbal *et al.*, 2009) em estudos realizados por HPLC. Por outro lado, outros estudos revelaram que as ciclodextrinas não aumentam a solubilidade da artemisinina suficientemente até o limite máximo da concentração de CD de 137.5 mM. (Illapakurthy, Sabnis *et al.*, 2003)



**Figura 61:** Gráficos relacionando a área corrigida do pico de AS em função da concentração de  $\beta$ CD para as amostras: a) de 1 a 13, b) de 1 a 13 réplica, c) de 1' a 13', d) de 1' a 13' réplica, e) de 1'' a 13'' e f) de 1'' a 13'' réplica.

#### 4.7. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os testes biológicos para o sistema ( $\beta$ CD:AS)1:1 foram realizados em colaboração com a Professora Dra. Antoniana Ursine Krettli, do Laboratório de Malária da Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou.

Foram realizados estudos de toxicidade aguda do composto de inclusão na dose de 200 mg/Kg por cinco dias, administrados por via oral. (n= 3 camundongos por grupo). O composto ( $\beta$ CD:AS)1:1 não apresentou toxicidade aos camundongos após 5 dias de administração em uma dose total de 1000 mg/Kg .

Adicionalmente, realizou-se ensaios para avaliar a atividade citotóxica do fármaco AS, bem como de seu composto de inclusão obtido na proporção 1:1, utilizando o ensaio de MTT e duas linhagens celulares: BGM (célula renal de macaco) e HepG2 (hepatoma humano). Os resultados encontram-se ilustrados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Avaliação da atividade citotóxica de AS,  $\beta$ CD e ( $\beta$ CD:AS)1:1 utilizando o ensaio de MTT e duas linhagens celulares: BGM (célula renal de macaco) e HepG2 (hepatoma humano).

Composto	MDL <sub>50</sub> $\mu$ g/mL			
	BGM		HepG2	
	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2
Artesunato	202	289	213	288
$\beta$ -Ciclodextrina	>1000	>1000	>1000	>1000
( $\beta$ -CD:AS)	961	>1000	672	690

Tais resultados indicam que as moléculas não apresentaram toxicidade *in vitro* para células renais e hepáticas. A dose máxima testada foi de 1000  $\mu$ g/mL.

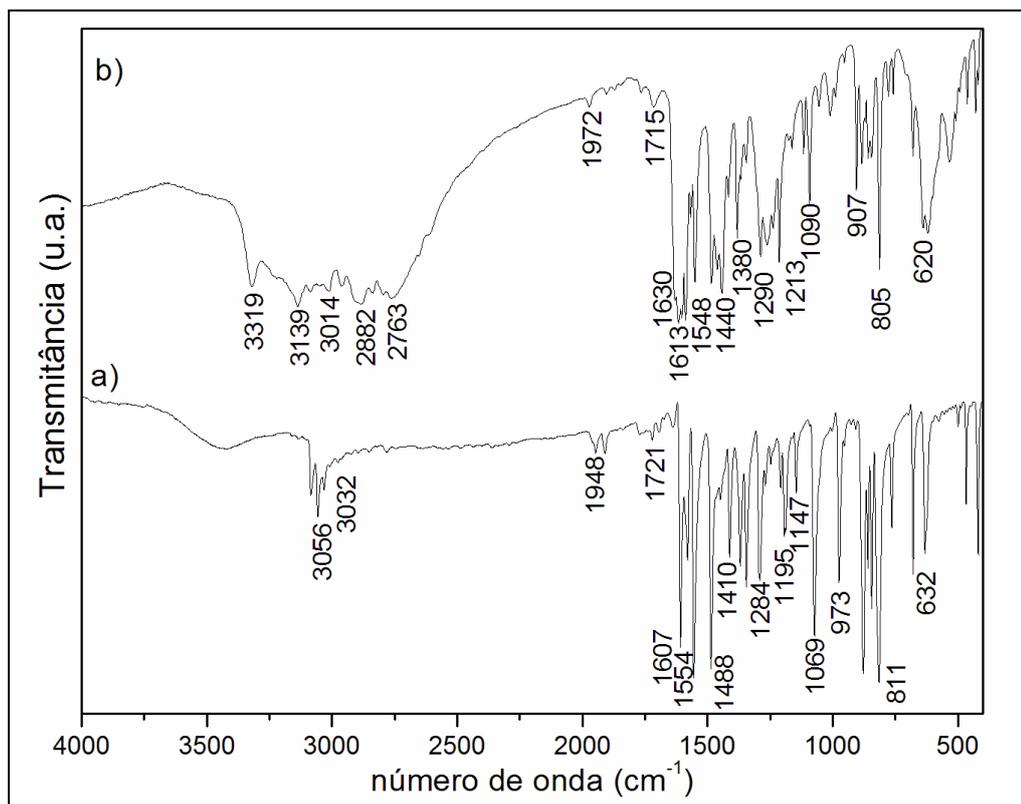
A literatura reporta diversos artigos que trazem o estudo da atividade biológica de artesunato associado à outros fármacos como mefloquina (Boareto, Muller *et al.*, 2012), ciprofloxacina (Andrade, Varotti *et al.*, 2007) e amodiaquina. (Navaratnam, Ramanathan *et al.*, 2009)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: SISTEMA CICLODEXTRINA/CLORIDRATO DE 1-(7-CLOROQUINOLIN-4-IL)TIOSEMICARBAZIDA (CQT).

A emergência e a disseminação de cepas resistentes aos fármacos antimaláricos disponíveis têm conduzido à busca por novos agentes potencialmente ativos. A síntese de análogos, (Jain, Khan *et al.*, 2005; Fattorusso, Campiani *et al.*, 2008; Sunduru, Srivastava *et al.*, 2009) bem como a coordenação de derivados quinolínicos à sítios metálicos como Rutênio, (Sanchezdelgado, Navarro *et al.*, 1996; Martinez, Rajapakse *et al.*, 2008) Ródio, (Sanchezdelgado, Navarro *et al.*, 1996) e Ouro, (Navarro, Perez *et al.*, 1997; Navarro, Vasquez *et al.*, 2004) são as alternativas mais descritas na literatura.

Nesse sentido, sintetizou-se o derivado quinolínico cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida, denominado CQT, com base na patente alemã depositada em 1964, (Heinz, 1964) como mencionado no Capítulo 2, Seção 2.2.1, o qual foi devidamente caracterizado por espectroscopia vibracional na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear.

Inicialmente, os espectros vibracionais obtidos na região do infravermelho para o precursor 4,7-dicloroquinolina e para o composto sintetizado CQT, encontram-se representados na Figura 62.



**Figura 62:** Espectros de absorção na região do infravermelho: a) 4,7-dicloroquinolina e b) cloridrato de 1-(7-cloroquinolin-4-il)tiossemicarbazida (CQT).

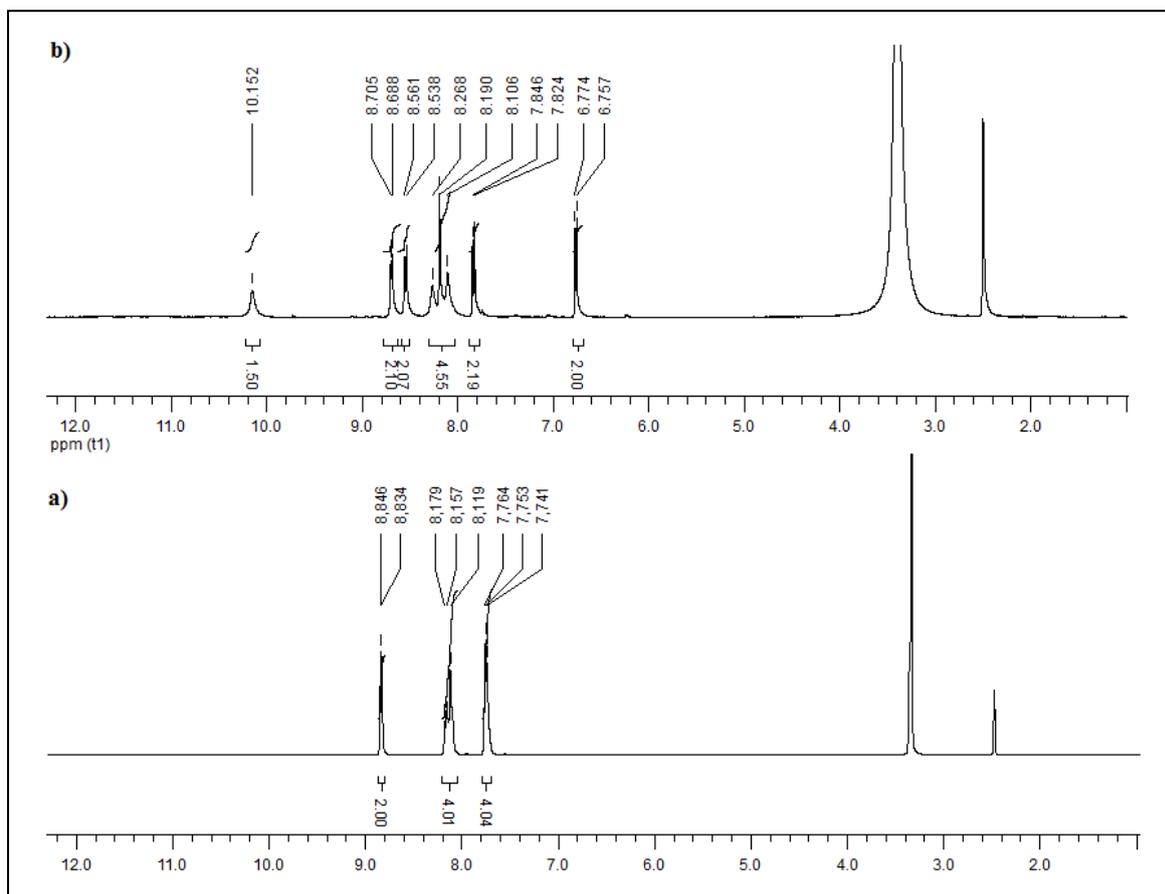
Analisando tais espectros observa-se um perfil distinto, uma vez que a molécula sintetizada CQT apresenta bandas mais alargadas no seu espectro em relação ao precursor 4,7-dicloroquinolina, cujas bandas são mais definidas. Merece destaque as bandas observadas 2763, 3139 e 3319  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas respectivamente ao modo de estiramento  $\nu(\text{N-H}\dots\text{O})$  de ligações de hidrogênio e à deformações axiais, assimétrica e simétrica, da ligação N-H da hidrazina, observada na cadeia lateral da molécula de CQT, indicando a formação do referido composto. Outra banda de relevância no processo de diferenciação de CQT em relação ao seu precursor se refere à banda atribuída ao estiramento da ligação C=S, a qual foi observada em aproximadamente 1250  $\text{cm}^{-1}$ , bem como a banda em 1630  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação angular da ligação N-H. Tais bandas sugerem a formação da molécula CQT, não sendo observadas no espectro do precursor 4,7-dicloroquinolina.

Na região de 1450  $\text{cm}^{-1}$  aparecem as bandas atribuídas ao estiramento CC/CN dos anéis aromáticos. As demais atribuições tentativas de alguns dos principais modos vibracionais para a molécula de CQT encontram-se descritas na Tabela 8.

**Tabela 8:** Tentativa de atribuição das principais bandas do espectro vibracional obtido na região do infravermelho para CQT (em  $\text{cm}^{-1}$ ).

IV ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições
624 810	$\nu_{(\text{C-Cl})}$
1015	Respiração do anel piridil
1091	$\nu_{(\text{C-C})}$
1210	Deformação do anel piridil
1256	$\nu_{(\text{C=S})}$
1381	$\nu_{(\text{C-C})}$
1438	$\nu_{(\text{CC})} / (\text{CN})$
1630	$\delta_{(\text{N-H})}$
3134	$\nu_{(\text{N-H})\text{sim}}$
3014	$\nu_{(\text{C-H})\text{arom}}$
3319	$\nu_{(\text{N-H})\text{assim}}$

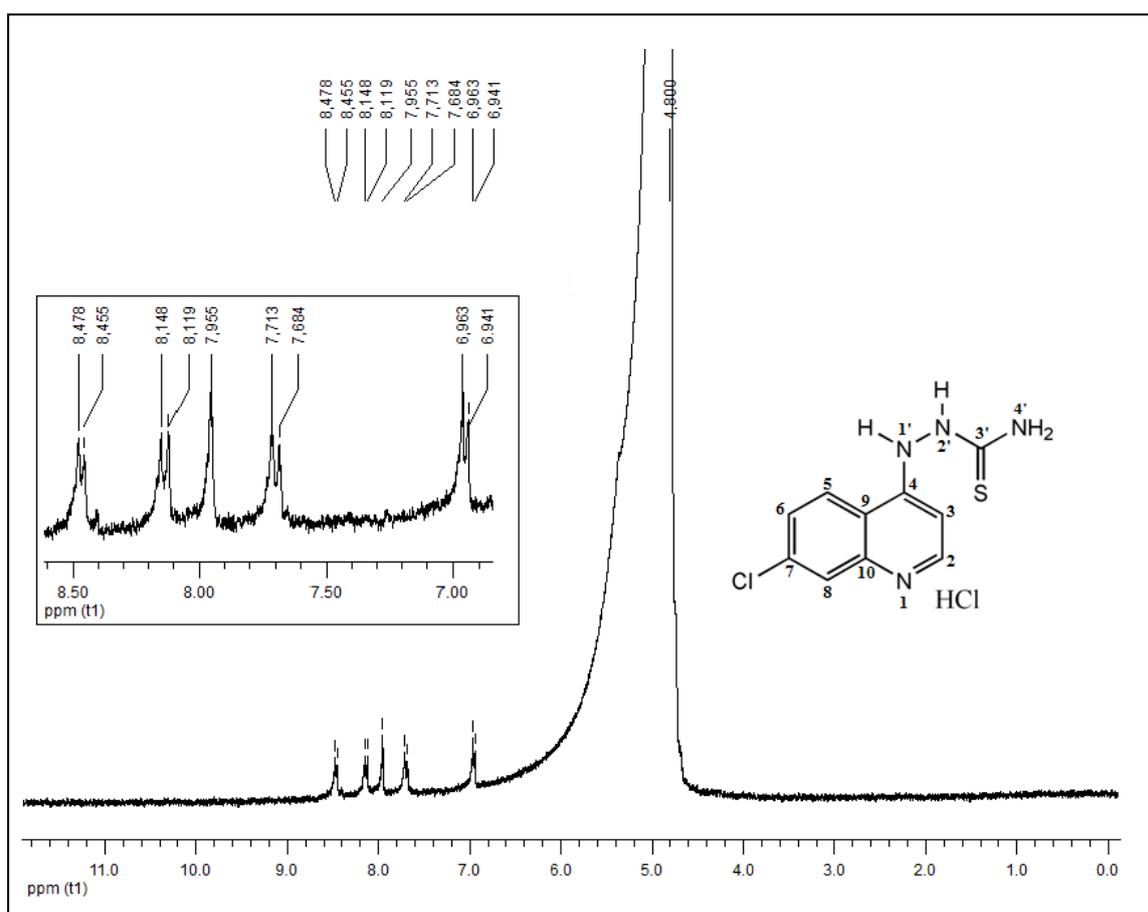
Na Figura 63, é apresentado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido em  $\text{DMSO-}d_6$ , obtido para o precursor 4,7-dicloroquinolina e para a molécula CQT, a  $27^\circ\text{C}$  em espectrômetro Bruker DRX400- AVANCE, frequência de 400MHz para o núcleo de hidrogênio. O emprego desta técnica teve como objetivo a caracterização estrutural da molécula hóspede, bem como para avaliar a pureza desta.



enquanto que os prótons de H5 foram atribuídos ao duplete observado em aproximadamente 8,6 ppm ( $\delta$  8,538 e  $\delta$  8,561), cuja constante de acoplamento é equivalente a 9,2 Hz. O singlete observado em 8,190 ppm é referente aos hidrogênios denominados H8.

O singlete observado em 10,152 ppm foi atribuído aos hidrogênios ligados ao heteroátomo N2'. Adicionalmente, observa-se que os prótons ligados ao nitrogênio denominado N4' encontram-se em ambientes químicos distintos e, portanto, são observados em 8,106 e 8,268 ppm. Tais sinais caracterizam estruturalmente a cadeia lateral de CQT, evidenciando assim, a formação da molécula de interesse. A partir da soma das integrais dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de CQT, é verificada a pureza do composto sintetizado e através da Figura 63, é possível constatar as divergências existentes entre os prótons de CQT e de seu precursor 4,7-dicloroquinolina.

Na Figura 64, está exposto o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido em  $\text{D}_2\text{O}$  em espectrômetro Bruker DRX400- AVANCE, frequência de 400MHz, para a molécula de CQT. Como esperado, os sinais referentes aos hidrogênios ligados à heteroátomo, não são observados.

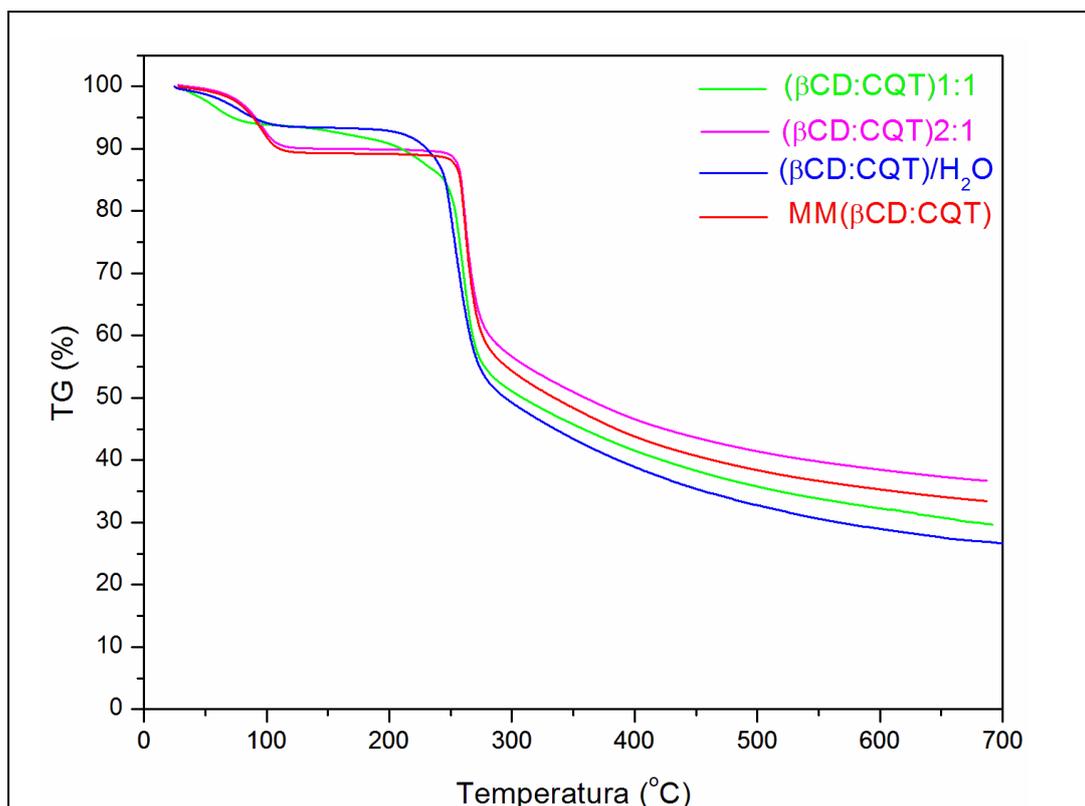


**Figura 64:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$  para CQT.

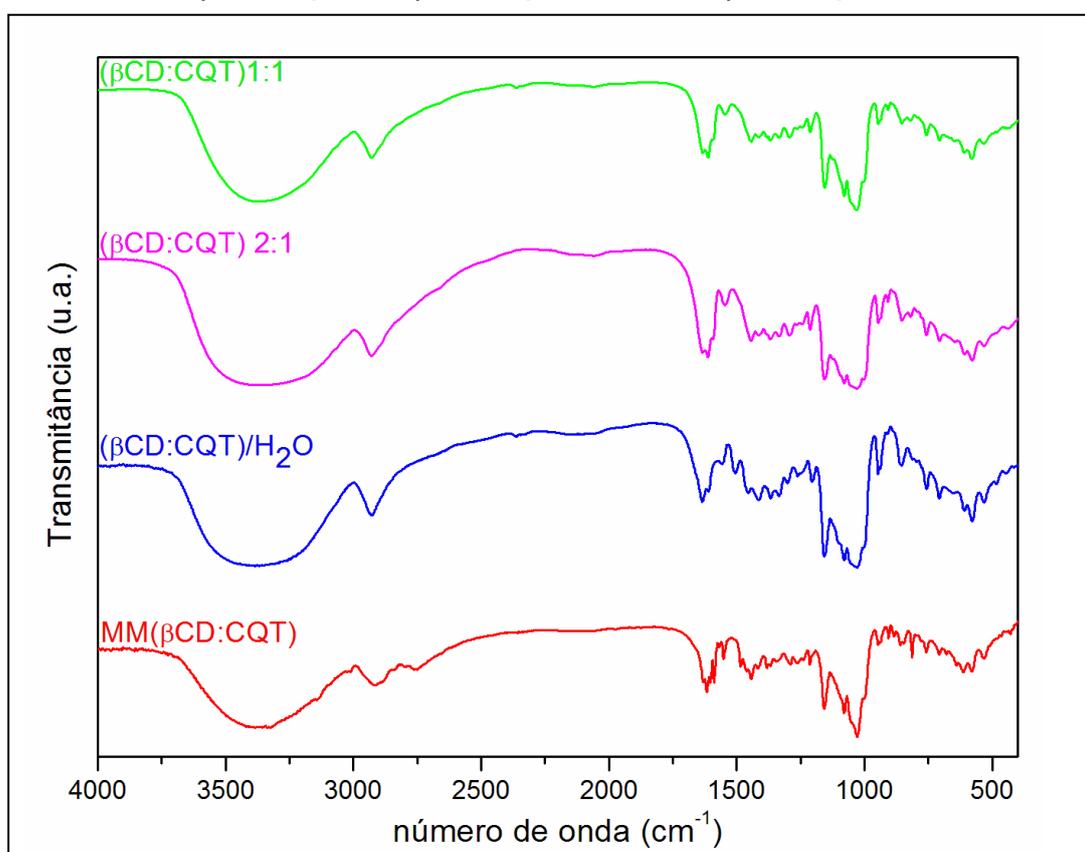
Com o intuito de melhorar as propriedades físico-químicas da molécula CQT, recorreu-se ao método de encapsulação com ciclodextrinas. Deste modo, como descrito na Seção 2.2.2.3, do Capítulo 2, foram preparados quatro compostos, os quais foram denominados ( $\beta$ CD:CQT)1:1, ( $\beta$ CD:CQT)2:1, ( $\beta$ CD:CQT)/H<sub>2</sub>O e ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, bem como as misturas mecânicas denominadas MM( $\beta$ CD:CQT) e MM( $\alpha$ CD:CQT), sendo os resultados mais relevantes descritos neste capítulo.

A Figura 65 traz os dados termogravimétricos obtidos para os sistemas ( $\beta$ CD:CQT)1:1, ( $\beta$ CD:CQT)2:1, ( $\beta$ CD:CQT)/H<sub>2</sub>O e MM( $\beta$ CD:CQT). Como pode ser observado através das curvas, o perfil térmico dos compostos preparados por nebulização se assemelham significativamente entre si e àquele obtido para a mistura mecânica. Tal informação é um indício de que os compostos de inclusão não estão presentes no estado sólido.

Os espectros vibracionais obtidos na região do infravermelho para as referidas amostras estão dispostos na Figura 66 e de modo análogo aos dados termogravimétricos exibem grande semelhança entre si. É importante enfatizar a banda de absorção observada em aproximadamente 3400 cm<sup>-1</sup>, atribuída ao modo de estiramento das ligações O-H. A referida banda, via de regra, apresenta perfil relativamente afilado nos compostos de inclusão em comparação à mistura mecânica, o que não ocorre nos compostos ( $\beta$ CD:CQT)1:1, ( $\beta$ CD:CQT)2:1, ( $\beta$ CD:CQT)/H<sub>2</sub>O. Outra banda que merece destaque, é aquela observada em aproximadamente 1000 cm<sup>-1</sup>, atribuída ao  $\nu$ (C-O-C) das ligações glicosídicas da  $\beta$ CD, a qual não apresentou alterações nos quatro espectros exibidos na Figura 66, indicando a ausência do fármaco no interior da cavidade da macromolécula.

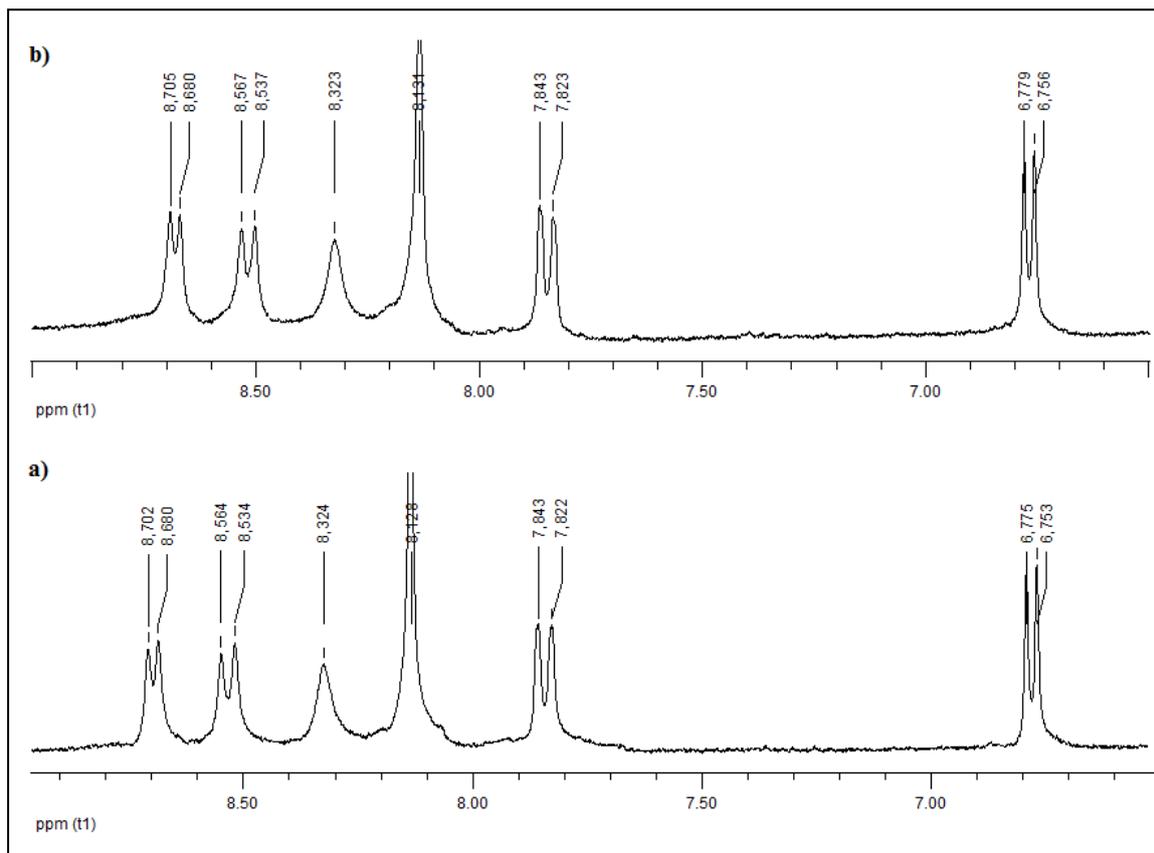


**Figura 65:** Curvas termogravimétricas obtidas para as amostras  $(\beta\text{CD}:\text{CQT})1:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{CQT})2:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{CQT})/\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MM}(\beta\text{CD}:\text{CQT})$ .



**Figura 66:** Espectros vibracionais obtidos na região do infravermelho para as amostras  $(\beta\text{CD}:\text{CQT})1:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{CQT})2:1$ ,  $(\beta\text{CD}:\text{CQT})/\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MM}(\beta\text{CD}:\text{CQT})$ .

Nos estudos realizados em solução por RMN em  $\text{DMSO-}d_6$  para tais sistemas, Figura 67, não são observadas variações de deslocamento químico significativas, que possam ser atribuídas a modificações no ambiente químico e magnético do sistema em função da inclusão. É válido mencionar que no espectro do composto  $(\beta\text{CD:CQT})2:1$ , Figura 67b, também não foram observadas modificações que pudessem sugerir algum tipo de interação entre a molécula hóspede e a hospedeira, indicando que mesmo utilizando excesso de  $\beta\text{CD}$  o composto de inclusão não se forma.

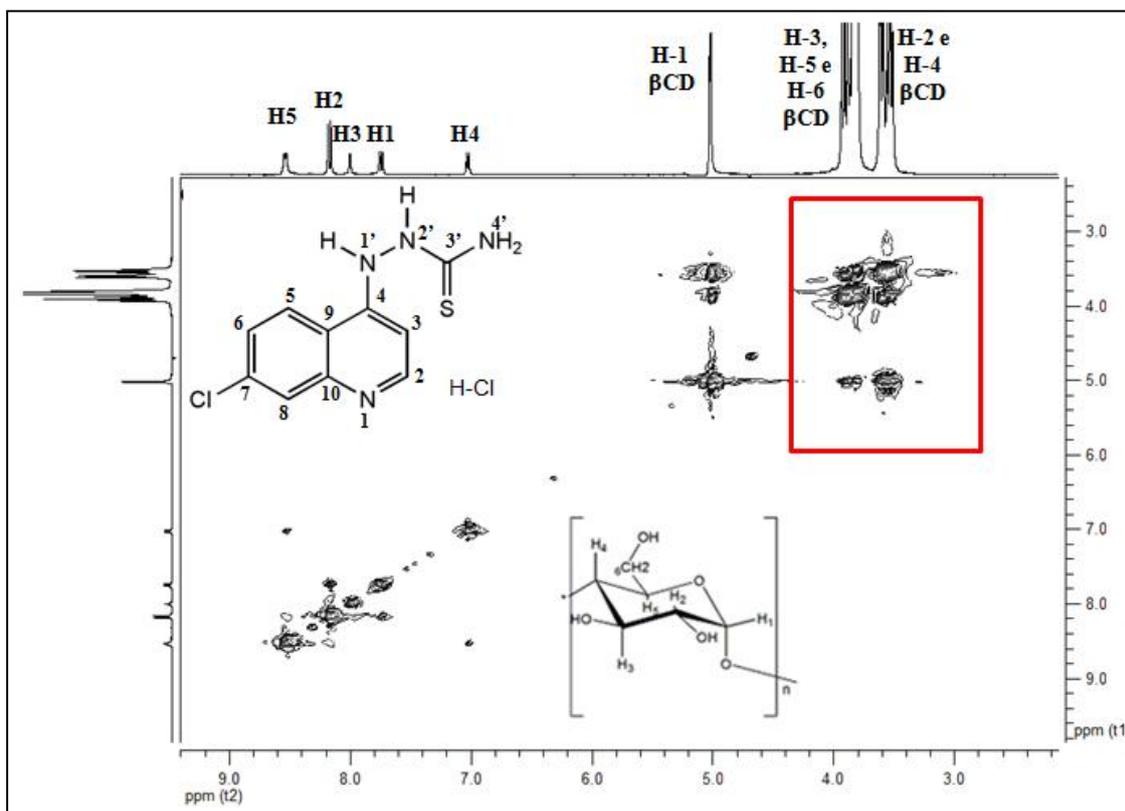


**Figura 67:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz em  $\text{DMSO-}d_6$  para: a)  $(\beta\text{CD:CQT})1:1$  e b)  $(\beta\text{CD:CQT})2:1$ .

Como causa desse resultado, cogitou-se a hipótese de que, de modo análogo ao sistema envolvendo  $\beta\text{CD}$  e AS, o composto de inclusão pudesse estar dissociado em  $\text{DMSO-}d_6$ . Para investigar a influência do solvente deuterado no processo de inclusão, realizou-se estudos por RMN utilizando  $\text{D}_2\text{O}$ . Deste modo, a Figura 68 traz o espectro 2D ROESY de apenas um dos sistemas citados anteriormente, o  $(\beta\text{CD:CQT})1:1$ , realizado no referido solvente.

Como pode ser observado, ao contrário do esperado, não observou-se manchas de correlação entre os hidrogênios internos da cavidade de  $\beta\text{CD}$  com os hidrogênios aromáticos do derivado quinolínico em estudo. As manchas destacadas de vermelho se

referem apenas às correlações entre hidrogênios da  $\beta$ CD. Tais informações evidenciam que o processo de inclusão entre CQT e  $\beta$ CD, não é favorecido nas condições experimentais utilizadas, enfatizando as indicações obtidas a partir das caracterizações realizadas no estado sólido.



**Figura 68:** Espectro de RMN 2D ROESY obtido em  $D_2O$ , para o sistema ( $\beta$ CD:CQT)1:1.

Com o intuito de investigar o motivo da não inclusão de CQT na cavidade de  $\beta$ CD, outros experimentos foram planejados e executados. No primeiro deles preparou-se um composto utilizando apenas água como solvente, uma vez que a presença do solvente orgânico etanol, poderia alterar a encapsulação como descrito na literatura. (Nakajima, 1984; Aree e Chaichit, 2003) Entretanto, o composto ( $\beta$ CD:CQT)/ $H_2O$ , cujas caracterizações termogravimétrica e espectroscópica foram descritas anteriormente, apresentou também grande similaridade nos espectros de RMN de  $^1H$  e ROESY, daqueles obtidos para os compostos denominados ( $\beta$ CD:CQT)1:1 e ( $\beta$ CD:CQT)2:1, indicando que mesmo em meio aquoso o processo de inclusão no referido sistema não foi favorecido.

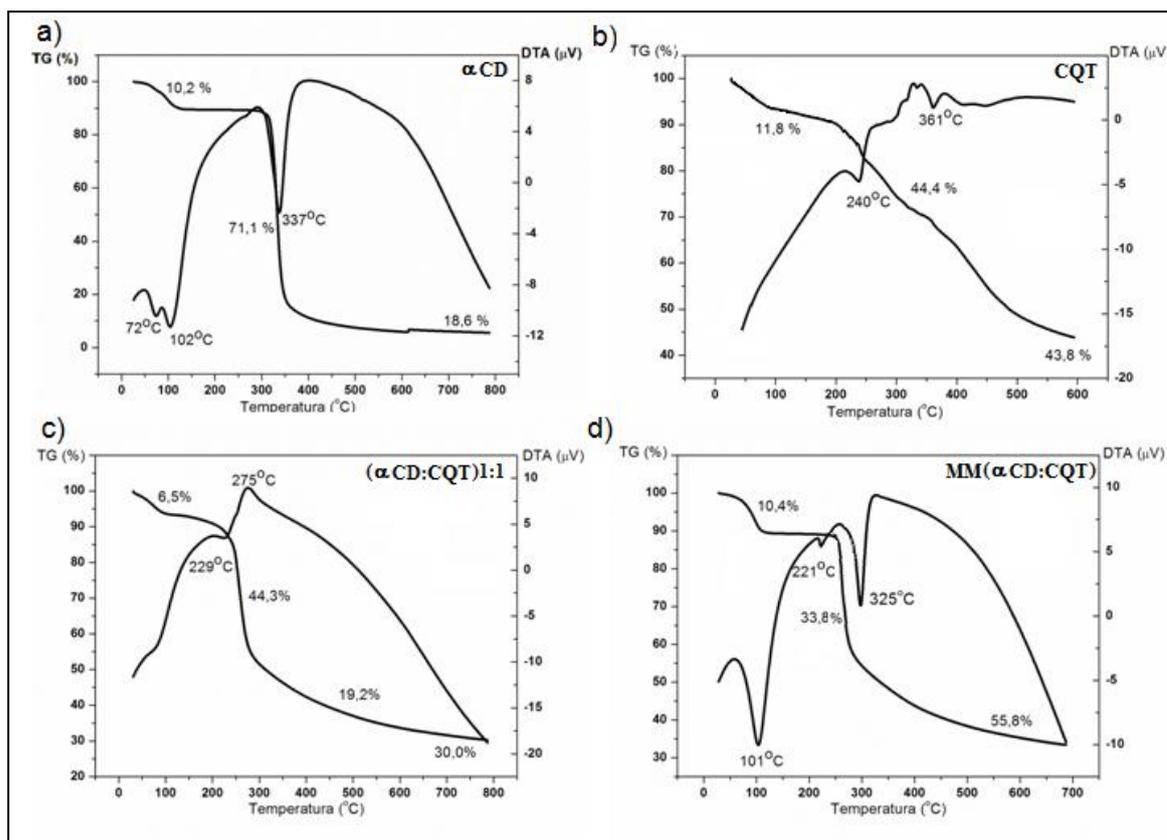
Em seguida, propôs-se um estudo da interação entre  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD) e CQT, através do composto ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, o qual foi preparado nas mesmas condições experimentais do composto ( $\beta$ CD:CQT)1:1, como descrito no capítulo 2 na seção 2.2.2.3. A utilização de  $\alpha$ CD foi baseada em um estudo teórico publicado recentemente envolvendo um novo parâmetro topológico para monitorar eventos de agregação em processos de inclusão com ciclodextrinas. (Novato, De Almeida *et al.*, 2012) No referido trabalho, os autores realizaram estudos envolvendo anfetamina como molécula hóspede e seus compostos com  $\beta$ CD e  $\alpha$ CD. Os cálculos indicaram que anfetamina e  $\beta$ CD formam compostos estáveis de baixa energia, enquanto que nos sistemas envolvendo anfetamina e  $\alpha$ CD, destaca-se a baixa estabilidade dos complexos de inclusão, com a molécula hóspede posicionada na esfera de agregação.

Neste contexto, uma hipótese para a encapsulação de CQT com  $\beta$ CD, não ter sido detectada pelas caracterizações realizadas, é o fato de as interações possivelmente estarem ocorrendo na esfera de agregação da molécula hospedeira, com a formação de compostos de inclusão de baixa estabilidade. Por outro lado, o estudo envolvendo  $\alpha$ CD é interessante no que tange ao tamanho dessa macromolécula em relação à molécula hóspede, que poderiam levar a interações mais efetivas e assim, a compostos mais estáveis.

Deste modo, investigou-se o composto ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, o qual foi devidamente caracterizado por técnicas no estado sólido e em solução, como descrito nas seções seguintes.

## 5.1. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.

Na Figura 69 estão expostas as curvas termogravimétricas TG e DTA, obtidas para os precursores  $\alpha$ CD e CQT, bem como para os compostos denominados ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 e MM( $\alpha$ CD:CQT).



**Figura 69:** Curvas TG e DTA para: a)  $\alpha$ CD, b) CQT, c)  $(\alpha$ CD:CQT)1:1 e d) MM( $\alpha$ CD:CQT).

As curvas TG/DTA da  $\alpha$ CD estão apresentadas na Figura 69a. O padrão de decomposição da  $\alpha$ CD é muito similar ao da  $\beta$ CD, descrito na seção 3.1. do capítulo 3. A curva TG obtida para CQT exhibe eventos de perda de massa pouco definidos, com o primeiro deles correspondendo à saída de HCl (obser. 11,8%, calc: 12,3%). Em seguida, observa-se a decomposição incompleta do derivado quinolínico. A curva DTA exhibe dois eventos endotérmicos, um em 240 e outro em 341 °C, referentes à fusão e decomposição, respectivamente.

Por outro lado, a curva TG do composto  $(\alpha$ CD:CQT)1:1 apresenta perfil distinto em relação às curvas obtidas para os precursores. Na faixa de temperatura de 0 a 98°C, observa-se a primeira perda de massa de 6,5% referente à saída de cinco moléculas de H<sub>2</sub>O (obser.: 6,5%; calc.: 6,7%) e em seguida a segunda perda de massa de 44,3% foi atribuída ao início da termodecomposição do composto de inclusão com a perda do derivado quinolínico CQT e duas unidades de glicopiranoses da  $\alpha$ CD (obser.: 44,3%; calc.: 45,4%). A termodecomposição incompleta do composto  $(\alpha$ CD:CQT)1:1 é marcada por uma terceira perda de 19,2 % referente à um fragmento de  $\alpha$ CD e um

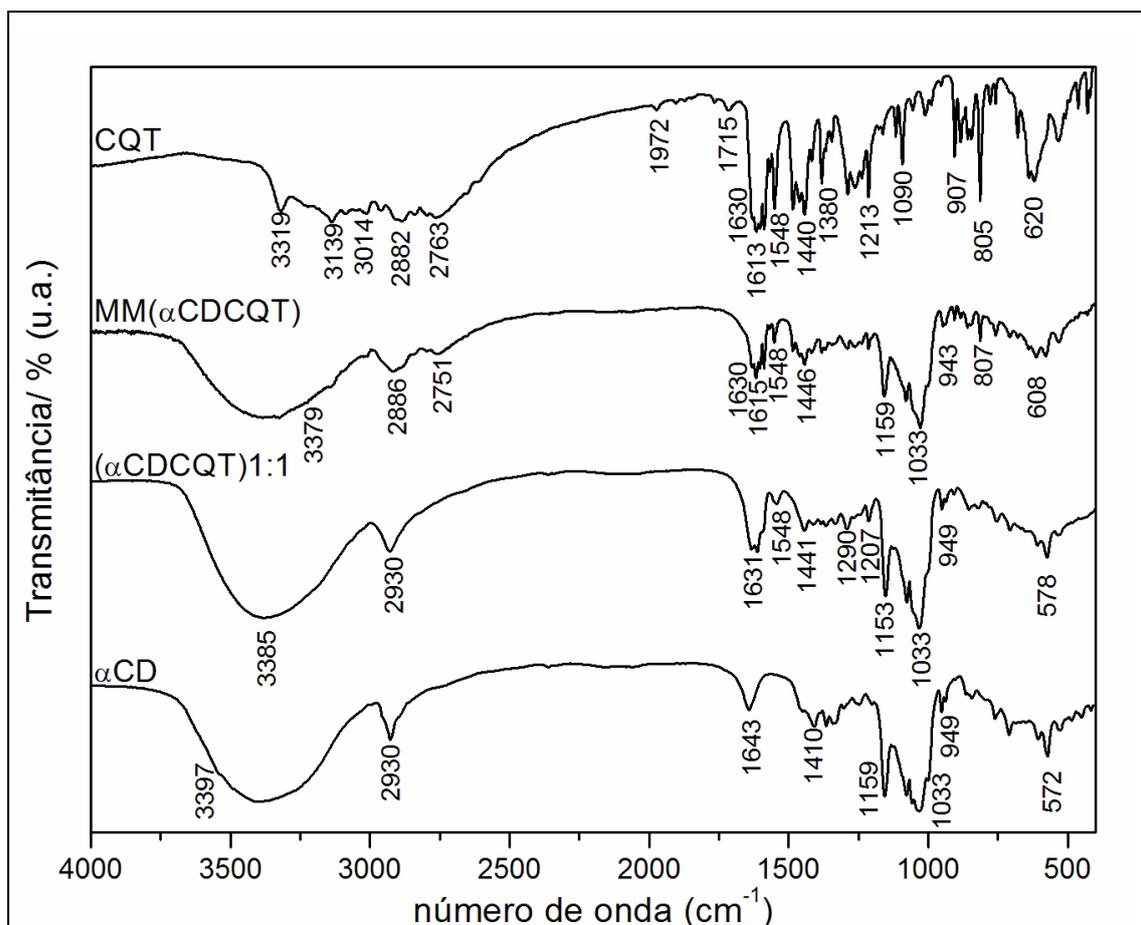
resíduo de 30% em 800°C, referente à material orgânico carbonizado. A curva DTA exhibe um perfil distinto daquela obtida para os precursores, com a presença de um evento endotérmico em 229°C e um exotérmico em 275 °C, ambos similares aos exibidos pela curva DTA de CQT livre, e nenhum evento similar aos da curva DTA de  $\alpha$ CD livre. Entretanto, os resultados termogravimétricos obtidos para a mistura mecânica MM( $\alpha$ CD:CQT) sugerem um somatório dos perfis térmicos de  $\alpha$ CD e CQT, separadamente, o que pode ser visualizado sobretudo, pelas curvas DTA dos mesmos.

## 5.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

De modo a caracterizar os modos vibracionais do composto denominado ( $\alpha$ CD:CQT), bem como da mistura mecânica MM( $\alpha$ CD:CQT), os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos, os quais encontram-se representados na Figura 70.

É importante mencionar que a  $\alpha$ CD apresenta o mesmo perfil vibracional que a  $\beta$ CD, cuja descrição foi realizada previamente (seção 3.2. do capítulo 3). Por outro lado, o estudo espectroscópico da molécula CQT livre, foi descrito no início deste capítulo. Uma vez caracterizadas as principais bandas de absorção na região do infravermelho para os precursores CQT e  $\alpha$ CD, a comparação qualitativa entre as mesmas e aquelas observadas nos espectros obtidos para ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 e MM( $\alpha$ CD:CQT) pôde ser realizada.

Inicialmente, destaca-se a alteração observada no perfil da banda 1033  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao  $\nu(\text{C-O-C})$  das ligações glicosídicas da  $\alpha$ CD. Como mencionado nas descrições espectroscópicas dos capítulos anteriores, esse comportamento indica que o referido modo vibracional apresenta limitações para ocorrer, o que pode ser justificado pela presença de uma molécula hospedeira na cavidade de  $\alpha$ CD.



**Figura 70:** Espectros vibracionais na região do infravermelho obtido para os precursores  $\alpha$ CD e CQT e para os compostos  $(\alpha$ CD:AS)1:1 e MM( $\alpha$ CD:AS).

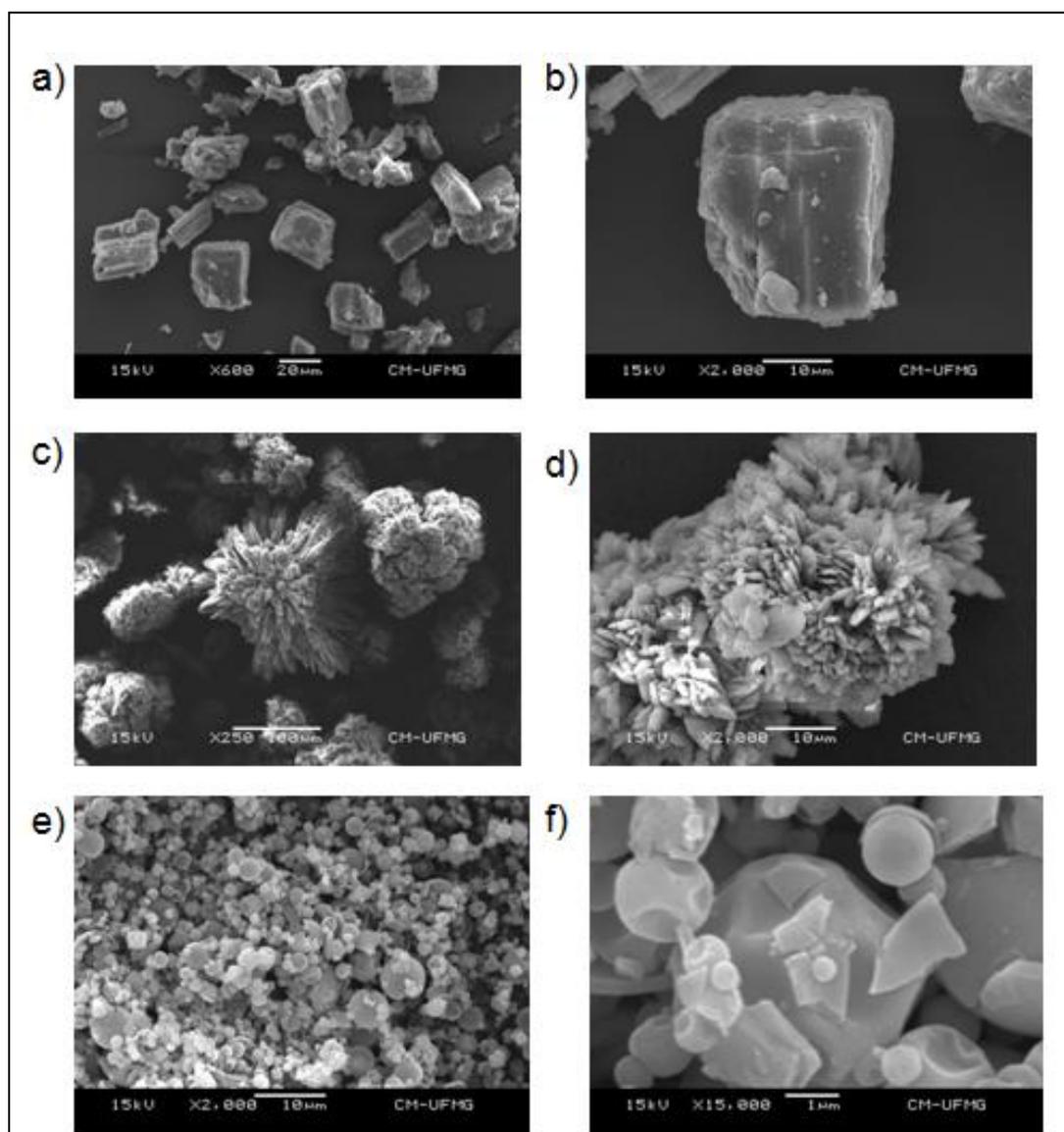
Adicionalmente, merece destaque a banda em  $3400\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligações O-H, a qual apresenta perfil ligeiramente afilado, sugerindo que ligações de hidrogênio podem ter sido quebradas após a saída de moléculas de água do interior da cavidade, como é provável de ocorrer durante o processo de inclusão. Ao contrário, o espectro vibracional obtido para a mistura mecânica se assemelha a um somatório entre os perfis vibracionais dos precursores e, portanto reforça a ideia de que interações podem estar ocorrendo no produto  $(\alpha$ CD:CQT)1:1 secado por nebulização. Adicionalmente, é possível identificar um grande número de bandas, observadas também no espectro de CQT livre, apesar da baixa intensidade destas.

As bandas observadas em  $1548$  e  $805\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas aos  $\nu(\text{CC/CN})$  e ao  $\delta(\text{C-H})$  dos anéis aromáticos, foram praticamente suprimidas no espectro de IV do composto  $(\alpha$ CD:CQT)1:1 em relação ao espectro da molécula de CQT livre. Esta supressão das bandas de infravermelho da CQT após a complexação com a  $\alpha$ CD, sugere uma forte interação entre as espécies no estado sólido.

### 5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), através do conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das suas propriedades e respostas químicas. Em especial, quando um composto de inclusão é formado, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura da molécula hóspede com a ciclodextrina. (Lyra, Alves *et al.*, 2010) Entretanto, apesar dos estudos de MEV serem inadequados para confirmarem a formação de compostos de inclusão, sabe-se que alterações drásticas na forma das partículas, bem como no seu aspecto e tamanho apontam para a existência de novas fases sólidas. (Lyra, Alves *et al.*, 2010)

Nas Figuras 71a e 71b observa-se a morfologia cristalina da  $\alpha$ CD e nas Figuras 71c e 71d uma estrutura menos regular e com características de amorficidade da molécula de CQT. Por outro lado, o composto de inclusão ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 apresenta estruturas arredondadas com diâmetro variando de 0,5 a 8  $\mu$ m, que parecem formar agregados.

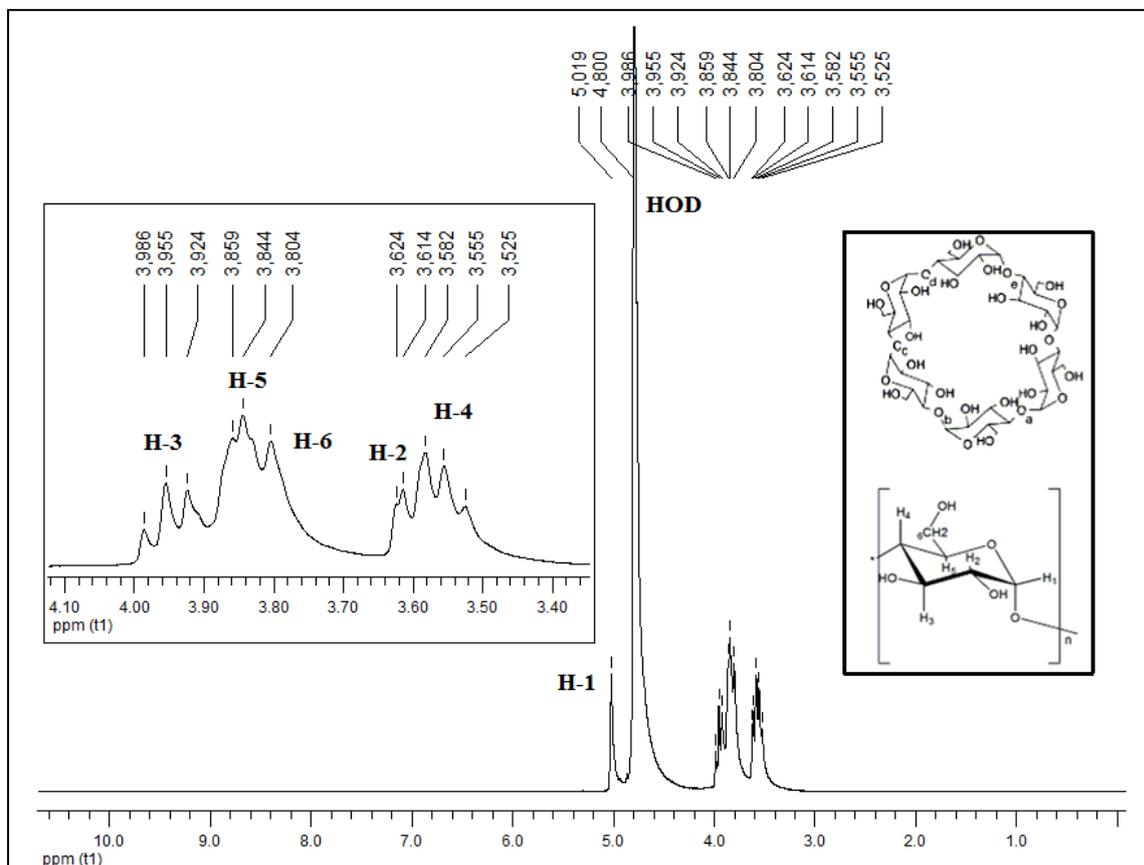


**Figura 71:** Micrografias obtidas para: a)  $\alpha$ CD com aproximação de 600 vezes, b)  $\alpha$ CD com aproximação de 2000 vezes, c) CQT com aproximação de 250 vezes, d) CQT com aproximação de 2000 vezes, e) composto ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 com aproximação de 2000 vezes e f) ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 com aproximação de 15000 vezes.

#### 5.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Como mencionado nos capítulos anteriores, a técnica em interesse constitui uma das técnicas analíticas mais poderosas e versáteis no estudo estrutural de moléculas, sobretudo de complexos de inclusão com ciclodextrinas. (Schneider, Hackett *et al.*, 1998) Deste modo, a mesma foi utilizada com a finalidade de caracterizar estruturalmente o composto de inclusão envolvendo  $\alpha$ CD e CQT, denominado ( $\alpha$ CD:CQT)1:1.

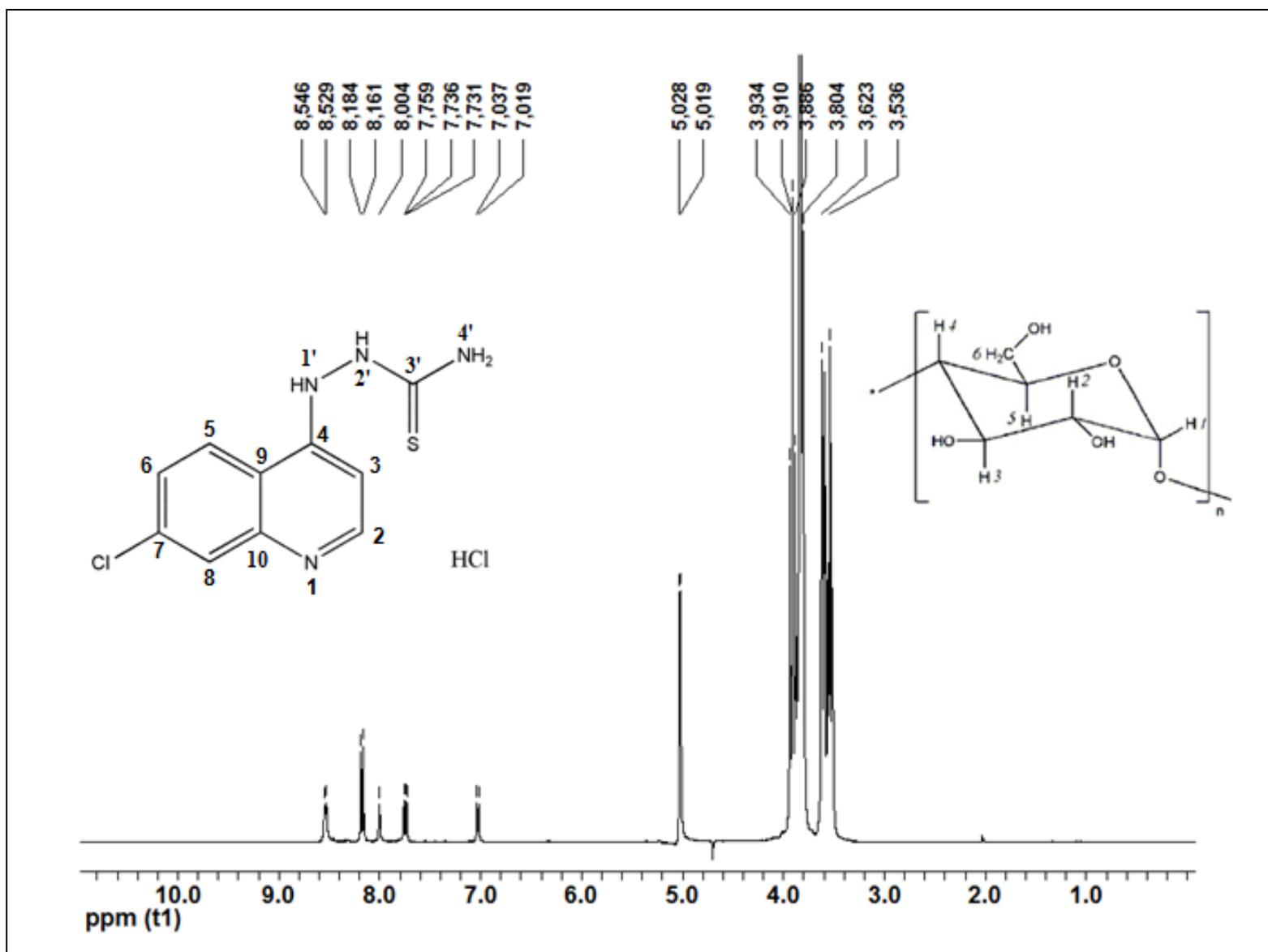
As atribuições dos sinais de RMN da  $\alpha$ CD em  $D_2O$ , Figura 72, foram realizadas com base em dados da literatura, (Wood, Hruska *et al.*, 1977) os quais são similares às atribuições feitas anteriormente para a  $\beta$ CD, como disposto na seção 3.4 do capítulo 3.



**Figura 72:** Ressonância Magnética Nuclear de  $^1H$  para a  $\alpha$ CD obtido em  $D_2O$ .

Uma vez realizada a atribuição completa dos sinais de RMN de hidrogênio para  $\alpha$ CD e para a molécula de CQT em  $D_2O$ , esta última com atribuições descritas no início deste capítulo, a caracterização estrutural do composto ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, por RMN, foi realizada.

O espectro de RMN de hidrogênio para o sistema ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 obtido em  $D_2O$ , encontra-se representado na Figura 73. Para o referido sistema supramolecular, ocorreram mudanças nos sinais de RMN de  $^1H$ , sendo a variação dos deslocamentos químicos apresentadas na Tabela 9.



**Figura 73:** Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  para o composto  $(\alpha\text{CD}:\text{CQT})_{1:1}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ .

**Tabela 9:** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (em 400MHz) de prótons do CQT livre e na presença de  $\alpha\text{CD}$ , usando  $\text{D}_2\text{O}$  e valores  $\Delta\delta$ .

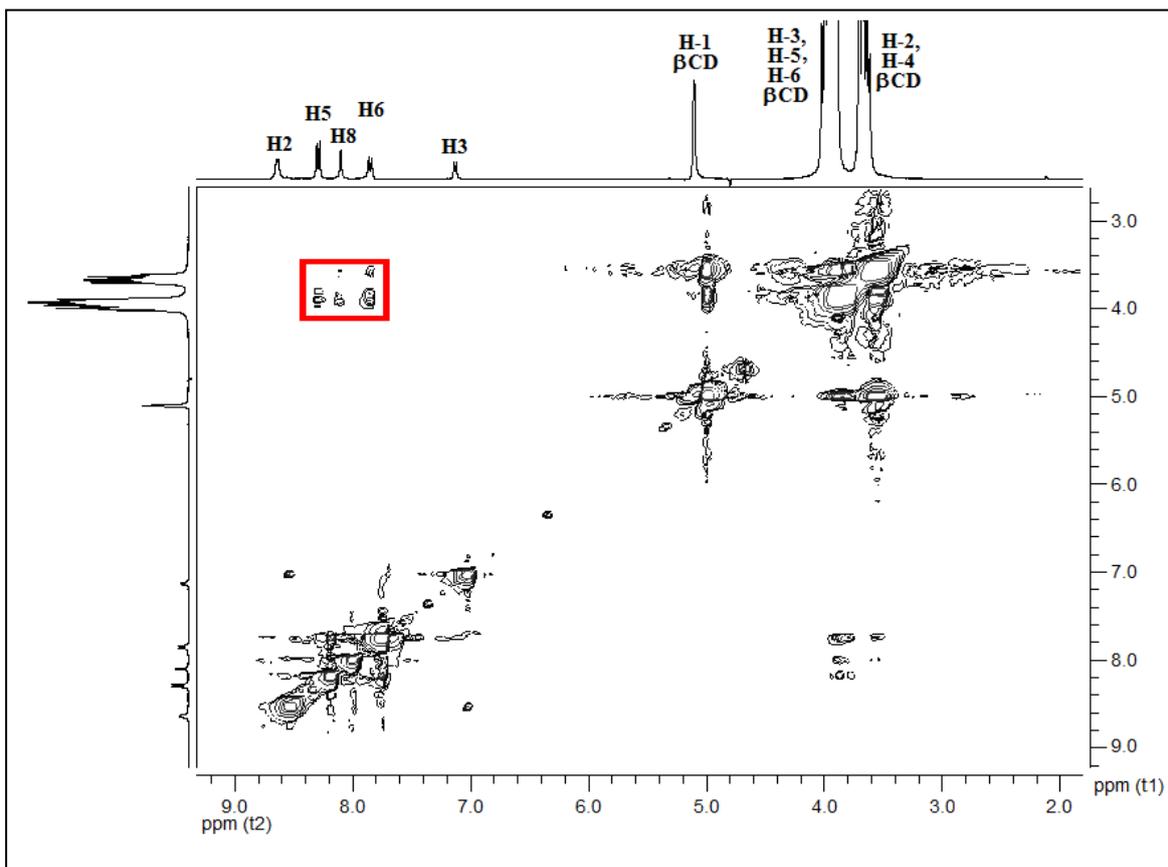
Atribuição	$\delta$ CQT	$\delta$ ( $\alpha\text{CD}:\text{CQT}$ )1:1	$\Delta\delta$ ( $\alpha\text{CD}:\text{AS}$ )1:1
H2	8,467	8,538	-0,071
H3	6,952	7,028	-0,076
H5	8,134	8,173	-0,039
H6	7,699	7,742	-0,043
H8	7,955	8,004	-0,049

Como pode ser observado, na presença de  $\alpha\text{CD}$  os hidrogênios H2, H3, H5, H6 e H8 da molécula CQT foram ligeiramente deslocados para região de campo alto, ou seja, se tornaram mais desblindados em relação à molécula CQT livre. As mudanças nos deslocamentos químicos indicam a presença de interações entre as espécies através da variação da densidade eletrônica de CQT após a complexação. Tais variações estão associadas com perturbações na densidade eletrônica causada pela inclusão de CQT na cavidade da  $\alpha\text{CD}$  e sua estabilização por interações não covalentes. (Denadai, Santoro, Da Silva *et al.*, 2006)

É amplamente descrito em diversos artigos de revisão da área, (Schneider, Hackett *et al.*, 1998; Lyra, Alves *et al.*, 2010) que sistemas do tipo hóspede-hospedeiro podem ser avaliados por meio de experimentos do tipo efeito nuclear Overhauser, os quais explicam as interações dipolares entre as espécies, podendo revelar a associação supramolecular do sistema. Neste enfoque, as interações entre CQT e  $\alpha\text{CD}$  foram investigadas também através de experimentos de RMN bidimensionais como 2D ROESY, cujo resultado é exposto na Figura 74.

Ao analisar um espectro de RMN, espera-se que as maiores variações de deslocamento químico sejam observadas para os núcleos pertencentes ao sítio de complexação. (Silverstein, 2005) Deste modo, para o sistema ora estudado, pode-se designar o hidrogênio H5 da molécula de CQT como o menos afetado na presença de  $\alpha\text{CD}$ , enquanto os hidrogênios H2 e H3 foram os mais afetados na presença da macromolécula. Entretanto, o espectro bidimensional ROESY contradiz esta

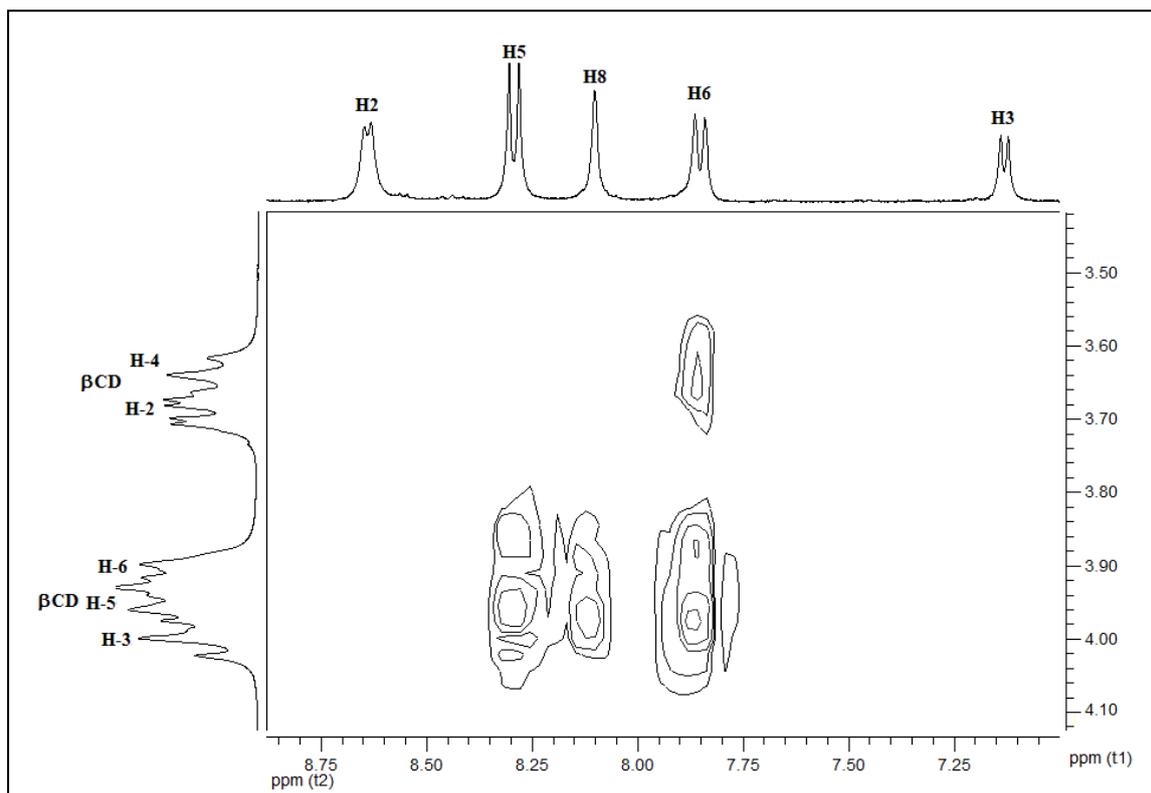
observação, indicando que a baixa solubilidade em água do ligante CQT livre, a qual levou à presença de ruídos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido em  $\text{D}_2\text{O}$  (Figura 64 deste capítulo), pode ter comprometido a análise comparativa dos deslocamentos químicos entre os hidrogênios do ligante livre e complexado em  $\alpha\text{CD}$ . Tal fato torna os dados experimentais obtidos por ROESY expostos na Figura 74, mais representativos para investigação do supracitado sistema.



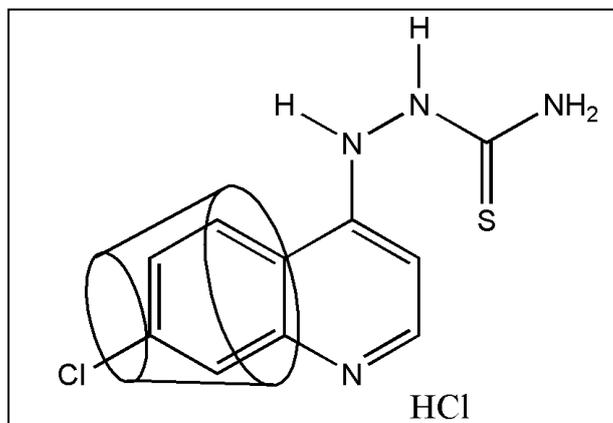
**Figura 74:** Mapa de contorno ROESY (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para o composto de inclusão ( $\alpha\text{CD}:\text{CQT}$ )1:1.

A análise do mapa de contornos ROESY, permitiu identificar algumas correlações indicativas de interação dipolar entre o potencial antimalárico CQT e a  $\alpha\text{CD}$ , comprovando a formação do complexo de inclusão ( $\alpha\text{CD}:\text{CQT}$ )1:1. Foram observadas correlações entre os hidrogênios do anel benzênico, indicando a inclusão em  $\alpha\text{CD}$  por esta porção da molécula de CQT, ao contrário do que indicou a análise dos deslocamentos químicos, a qual sugeriu a inclusão pelo anel piridínico, como descrito previamente. A Figura 75 traz a expansão do mapa de contorno ROESY na região de

7,00 a 8,80 ppm, na qual observa-se claramente a presença de correlações entre os hidrogênios H5, H6 e H8 de CQT com os hidrogênios internos H-3 e H-5 da macromolécula, evidenciando a presença de interações do tipo hóspede-hospedeiro no sistema estudado. Além disso, não foram observadas manchas de correlação entre os hidrogênios piridínicos H2 e H3 com hidrogênios da  $\alpha$ CD, indicando a inclusão superficial de CQT, cuja proposta mais provável encontra-se exposta na Figura 76.



**Figura 75:** Expansão do mapa de contorno ROESY (400 MHz, D<sub>2</sub>O) para o composto de inclusão ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, na região de 7,00 a 9,00 ppm.



**Figura 76:** Proposta estrutural para o complexo ( $\alpha$ CD:CQT)1:1.

A literatura reporta outros estudos envolvendo derivados quinolínicos e ciclodextrinas. (Yamada, Imai *et al.*, 2000; Fan, Diao *et al.*, 2006) Em um deles, dados de difração de raios X de monocristal foram descritos. (Fan, Diao *et al.*, 2006)

### 5.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os testes biológicos envolvendo CQT foram realizados em colaboração com a Professora Dra. Antoniana Ursine, do Laboratório de Malária, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou.

A atividade *in vivo* de CQT foi testada contra *P. berghei*, cujos resultados estão dispostos na Tabela 10. Através dos estudos realizados, constatou-se que o potencial antimalárico CQT foi ativo no quinto e sétimo dias, reduzindo aproximadamente 66 % da parasitemia. Como esperado, a molécula hospedeira  $\beta$ -ciclodextrina, não apresentou atividade. Entretanto, o composto ( $\beta$ CD/CQT)1:1 não foi testado, devido ao fato de não haver interações efetivas entre a molécula em estudo CQT e a hospedeira, como foi evidenciado a partir das caracterizações, tornando o experimento inconclusivo.

**Tabela 10:** Atividade *in vivo* de CQT contra *P. berghei*, foram utilizados os controle  $\beta$ -Ciclodextrina e cloroquina.

Molécula	Dose (mg/kg)	5º Dia		7º Dia		9º Dia	
		Parasitemia Média	% Redução	Parasitemia Média	% Redução	Parasitemia Média	% Redução
CQT	100	2,3	66,5	3,7	60	8,2	0
$\beta$ CD	100	8	0	10,3	0	5,8	12,8
Cloroquina	20	0	100	0	100	0	100
Não Tratado	-	7	-	9,3	-	6,7	-

Foi realizada também a avaliação da atividade citotóxica *in vitro* em células renais e hepáticas. Como pode ser observado na Tabela 11, as moléculas não apresentaram toxicidade, sendo a dose máxima testada de 1000  $\mu$ g/mL.

**Tabela 11:** Avaliação da atividade citotóxica, utilizando o ensaio de MTT e duas linhagens celulares: BGM (célula renal de macaco) e HepG2 (hepatoma humano).

Composto	MDL <sub>50</sub> ug/mL			
	BGM		HepG2	
	Exp1	Exp2	Exp1	Exp2
$\beta$ -Ciclodextrina	>1000	>1000	>1000	>1000
CQT	>1000	>1000	>1000	>1000
$\beta$ -CD/CQT	>1000	>1000	>1000	>1000

## 6. CONCLUSÕES

Compostos entre o antileishmanico isotionato de pentamidina (PNT) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), foram preparados pelo método de liofilização com o objetivo de aumentar a estabilidade do referido fármaco, bem como sua atividade por via oral. Adicionalmente estudos foram realizados envolvendo o antimalárico artesunato (AS) e o potencial antimalárico cloridrato de 1,7-cloroquinolina, denominado CQT, com  $\beta$ CD preparado por nebulização, visando um aumento de solubilidade, biodisponibilidade e manutenção da integridade estrutural. Os referidos compostos foram caracterizados no estado sólido através das técnicas análise termogravimétrica (TG/DTA), espectroscopia vibracional na região do infravermelho e microscopia eletrônica de varredura e em solução, os mesmos foram caracterizados por Espectrometria de Massa com Ionização por “Eletrospray” (IES-EM) e por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e bidimensional ROESY. Os compostos envolvendo  $\beta$ CD e PNT foram também caracterizados em solução por Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC).

Os espectros vibracionais e as análises termogravimétricas dos compostos estudados são similares e estão em pleno acordo com outros sistemas descritos na literatura. Em especial a espectroscopia vibracional permitiu estabelecer diferenças entre os compostos ( $\beta$ CD:PNT)1:1, ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\alpha$ CD:CQT)1:1 e seus respectivos precursores e misturas mecânicas, fornecendo indícios da formação de tais compostos de inclusão no estado sólido.

Baseado nas caracterizações realizadas para os sistemas envolvendo  $\beta$ CD e PNT constatou-se que as técnicas ITC, IES-EM e RMN ( $^1\text{H}$  e ROESY) são eficazes para investigação das interações hópede-hospedeiro em solução aquosa nos mesmos. Os experimentos de ITC permitiram determinar os parâmetros termodinâmicos do processo de inclusão, sendo que o coeficiente estequiométrico, obtido a partir desta técnica, indicou a presença de mais de um sistema supramolecular simultaneamente em equilíbrio em solução aquosa. Através dos espectros de IES-EM para os compostos ( $\beta$ CD:PNT)1:1, ( $\beta$ CD:PNT)2:1, ( $\beta$ CD:PNT)3:1 e ( $\beta$ CD:PNT)4:1, os compostos ( $\beta$ CD:PNT)1:1 e ( $\beta$ CD:PNT)2:1 foram claramente detectados, corroborando os resultados obtidos por ITC, sugerindo que tais compostos coexistem em equilíbrio em solução aquosa. Uma característica interessante extraída dos espectros IES-EM é que o composto de inclusão ( $\beta$ CD:PNT)2:1, apresenta uma abundância relativa alta comparado ao composto ( $\beta$ CD:PNT)1:1, a medida em que se aumenta a concentração

da  $\beta$ CD nas quatro razões molares estudadas. Adicionalmente, íons moleculares referentes aos compostos de inclusão nas proporções molares 3:1 e 4:1/  $\beta$ CD:PNT não foram observados nos espectros.

Mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da PNT e do AS, foram observadas nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , quando na presença de  $\beta$ CD. Os resultados indicaram que a adição de  $\beta$ CD acima da razão molar de 2:1 no sistema envolvendo  $\beta$ CD:PNT e acima da razão molar 1:1 no sistema  $\beta$ CD:AS, não alterou a estrutura do sistema supramolecular. O mapa de contorno 2D ROESY permitiu inferir sobre a inclusão profunda do fármaco PNT na  $\beta$ CD, através da presença de manchas de correlação entre hidrogênios aromáticos e alifáticos do fármaco com os hidrogênios H-3 e H-5 internos da cavidade da  $\beta$ CD. Por outro lado, os dados de RMN  $^1\text{H}$  e 2D ROESY, obtidos para o sistema  $\beta$ CD:AS, não foram conclusivos para a elucidação de interações presentes no referido composto, devido à sobreposição do sinal do hidrogênio H12 de AS, com os sinais referentes à OH-2 e OH-3 da  $\beta$ CD. Entretanto, os resultados obtidos pela técnica DOSY, permitiram verificar que ambos, AS e  $\beta$ CD, apresentam o mesmo coeficiente de difusão, indicando a existência de algum tipo de interação entre as supracitadas moléculas em solução, conforme evidenciado pelos resultados obtidos por ESI-MS.

Os ensaios biológicos realizados para o sistema ( $\beta$ CD:PNT)1:1 tiveram como objetivo avaliar a atividade por via oral do fármaco PNT, quando encapsulado em  $\beta$ CD, em relação ao fármaco livre. Para tanto, cinco grupos de camundongos da raça BALBc foram tratados por gavagem durante vinte dias com Salina, Glucantime, PNT, ( $\beta$ CD:PNT)1:1 e  $\beta$ CD, respectivamente. Os resultados indicaram que tanto no fígado quanto no baço, não houve diferença entre o grupo tratado com PNT na dose de 50mg/kg, quando comparado ao grupo controle tratado com solução salina, como era esperado já que o referido fármaco não apresenta atividade por via oral. Entretanto, o grupo tratado com ( $\beta$ CD:PNT)1:1 apresentou uma significativa redução da parasitemia em relação aos demais grupos, sendo mais eficaz para tratar leishmaniose em baço. Os estudos realizado para o sistema ( $\beta$ CD:PNT)1:1, indicaram que o processo de encapsulação da PNT com  $\beta$ CD, alterou as características de absorção do referido fármaco, tornando esse método uma alternativa promissora ao tratamento da Leishmaniose.

Os resultados indicaram a ausência de interações efetivas entre o potencial antimalárico CQT e a molécula hospedeira  $\beta$ CD, mesmo investigando rotas e solventes distintos, durante a preparação do composto de inclusão. Curiosamente, os dados experimentais indicaram a formação do composto de inclusão formado entre CQT e  $\alpha$ CD, na proporção molar de 1:1, tanto no estado sólido quanto em solução. Em especial, os resultados obtidos por ROESY em  $D_2O$ , evidenciaram correlações entre os hidrogênios H5, H6 e H8 de CQT com os hidrogênios internos da macromolécula, indicando a inclusão de CQT em  $\alpha$ CD pelo anel benzênico.

Neste contexto, as caracterizações sugeriram a formação do complexo supramolecular ( $\beta$ CD:PNT)1:1 em equilíbrio com o sistema ( $\beta$ CD:PNT)2:1, e a formação dos compostos de inclusão ( $\beta$ CD:AS)1:1 e ( $\alpha$ CD:CQT)1:1, em que diversas interações não covalentes podem contribuir para a formação dos referidos compostos de inclusão, como interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals e interações de hidrogênio.

**REFERÊNCIAS**

- Al-Saadi, M. S., H. M. Faidallah, *et al.* Synthesis and biological evaluation of some 2,4,5-trisubstituted thiazole derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. Archiv Der Pharmazie, v.341, n.7, Jul, p.424-434. 2008.
- Alam, M. M., M. Shaharyar, *et al.* Synthesis of Novel 8-Hydroxy Quinolin Based 1,3,4-oxadiazoles and S-substituted 1,2,4-triazole Derivatives and Evaluation of their Anti-inflammatory, Analgesic, Ulcerogenic and Anti-Microbial Activities. Medicinal Chemistry, v.7, n.6, Nov, p.663-673. 2011.
- Andrade, A. A., F. D. Varotti, *et al.* Enhanced activity of mefloquine and artesunic acid against *Plasmodium falciparum* in vitro and *P-berghei* in mice by combination with ciprofloxacin. European Journal of Pharmacology, v.558, n.1-3, Mar, p.194-198. 2007.
- Ansari, M. T., I. Iqbal, *et al.* Dihydroartemisinin-cyclodextrin complexation: Solubility and stability. Archives of Pharmacal Research, v.32, n.1, Jan, p.155-165. 2009.
- Araújo, N. K., A.; Katz, N.:. Avaliação terapêutica do artesunato na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*; . Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.32(1), p.7-12. 1999.
- Aree, T. e N. Chaichit. A new crystal form of beta-cyclodextrin-ethanol inclusion complex: channel-type structure without long guest molecules. Carbohydrate Research, v.338, n.15, Jul, p.1581-1589. 2003.
- Ashley, J. N. B., H. J.; Ewins, A. J.; Newbery, G.; Self, A. D. e H. Chemotherapeutic comparison of the trypanocidal action of some aromatic diamidines. J. Chem. Soc, p.103-116. 1942.
- Augustijns, P., A. Dhulst, *et al.* Transport of artemisinin and sodium artesunate in Caco-2 intestinal epithelial cells. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.85, n.6, Jun, p.577-579. 1996.
- Bakunov, S. A., S. M. Bakunova, *et al.* Synthesis and Antiprotozoal Activity of Cationic 1,4-Diphenyl-1H-1,2,3-triazoles. Journal of Medicinal Chemistry, v.53, n.1, Jan, p.254-272. 2010.
- Bakunova, S. M., S. A. Bakunov, *et al.* Synthesis and Antiprotozoal Activity of Pyridyl Analogues of Pentamidine. Journal of Medicinal Chemistry, v.52, n.15, Aug, p.4657-4667. 2009.
- Balint, G. A. Artemisinin and its derivatives - An important new class of antimalarial agents. Pharmacology & Therapeutics, v.90, n.2-3, May-Jun, p.261-265. 2001.
- Banerjee, D., M. A. C. Broeren, *et al.* An NMR study of the supramolecular chemistry of modified poly(propyleneimine) dendrimers. Macromolecules, v.37, n.22, Nov, p.8313-8318. 2004.

Banerjee, G., G. Nandi, *et al.* Drug delivery system: Targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.38, n.1, Jul, p.145-150. 1996.

Bardosh, K., S. Thys, *et al.* Socio-cultural research on the neglected zoonotic diseases in Africa: a review of the literature and outline for a future research agenda. Tropical Medicine & International Health, v.16, Oct, p.203-203. 2011.

Bates, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International Journal for Parasitology, v.37, n.10, Aug, p.1097-1106. 2007.

Batty, K. T., T. M. E. Davis, *et al.* Selective high-performance liquid chromatographic determination of artesunate and alpha- and beta-dihydroartemisinin in patients with falciparum malaria. Journal of Chromatography B-Biomedical Applications, v.677, n.2, Mar, p.345-350. 1996.

Batty, K. T., K. F. Ilett, *et al.* Chemical stability of artesunate injection and proposal for its administration by intravenous infusion. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.48, n.1, Jan, p.22-26. 1996.

Benoit-Vical, F., J. Lelievre, *et al.* Trioxaquines are new antimalarial agents active on all erythrocytic forms, including gametocytes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.51, n.4, Apr, p.1463-1472. 2007.

Biltonen, R. L., N. Langerman, *et al.* [14] Microcalorimetry for biological chemistry: Experimental design, data analysis, and interpretation. In: (Ed.). Methods in Enzymology: Academic Press, v.Volume 61, 1979. [14] Microcalorimetry for biological chemistry: Experimental design, data analysis, and interpretation, p.287-318

Blessum, C., J. O. Jeppsson, *et al.* Capillary electrophoresis: principles and practice in clinical laboratory. Annales De Biologie Clinique, v.57, n.6, Nov-Dec, p.643-657. 1999.

Boareto, A. C., J. C. Muller, *et al.* Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rats. Reproductive Toxicology, v.34, n.4, Dec, p.658-664. 2012.

Bouchemal, K., P. Couvreur, *et al.* A comprehensive study on the inclusion mechanism of benzophenone into supramolecular nanoassemblies prepared using two water-soluble associative polymers. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v.98, n.1, Oct, p.57-64. 2009.

Braga, E. M., L. H. Carvalho, *et al.* Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.66, n.3, Mar, p.299-303. 2002.

Brockman, A., R. N. Price, *et al.* Plasmodium falciparum antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.94, n.5, Sep-Oct, p.537-544. 2000.

Burki, T. From quinine to artesunate in Africa. Lancet Infectious Diseases, v.11, n.6, Jun, p.428-429. 2011.

Cabrita, E. J. e S. Berger. DOSY studies of hydrogen bond association: tetramethylsilane as a reference compound for diffusion studies. Magnetic Resonance in Chemistry, v.39, Dec, p.S142-S148. 2001.

Calderini, A. e F. B. T. Pessine. Synthesis and characterization of inclusion complex of the vasodilator drug minoxidil with beta-cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.60, n.3-4, Apr, p.369-377. 2008.

Cesar, I. D., F. H. A. Nogueira, *et al.* Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.48, n.3, Nov, p.951-954. 2008.

Chagas, A. P. Lavoisier e Laplace e os inícios da termodinâmica química. Química Nova, v.15(3), p.269-273. 1992.

Charpentier, T. H., P. T. Wilder, *et al.* Divalent metal ion complexes of S100B in the absence and presence of pentamidine. Journal of Molecular Biology, v.382, n.1, Sep, p.56-73. 2008.

Christen.Jj, R. M. Izatt, *et al.* Thermodynamics of Metal Cyanide Coordination .V. Log K Deltah Degree and Deltas Degree Values for Hg<sup>2+</sup>-Cn-System. Inorganic Chemistry, v.4, n.9, p.1278-&. 1965.

Christen.Jj. Entropy Titration . a Calorimetric Method for Determination of Deltag Deltah and Deltas from a Single Thermometric Titration. Journal of Physical Chemistry, v.70, n.6, p.2003-&. 1966.

Chu, L. Y., T. Yamaguchi, *et al.* A molecular-recognition microcapsule for environmental stimuli-responsive controlled release. Advanced Materials, v.14, n.5, Mar, p.386-389. 2002.

Correia, I., N. Bezzene, *et al.* Study of inclusion complexes of acridine with beta- and (2,6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin by use of solubility diagrams and NMR spectroscopy. Journal of Physical Organic Chemistry, v.15, n.9, Sep, p.647-659. 2002.

Croft, S. L., M. P. Barrett, *et al.* Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. Trends in Parasitology, v.21, n.11, Nov, p.508-512. 2005.

Croft, S. L. e G. H. Coombs. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends in Parasitology, v.19, n.11, Nov, p.502-508. 2003.

Croft, S. L. e V. Yardley. Chemotherapy of leishmaniasis. Current Pharmaceutical Design, v.8, n.4, p.319-342. 2002.

Cruz, I., J. Nieto, *et al.* Leishmania/HIV co-infections in the second decade. Indian Journal of Medical Research, v.123, n.3, Mar, p.357-388. 2006.

Cunico, W., M. D. G. Ferreira, *et al.* Synthesis and antimalarial activity of novel hydroxyethylamines, potential aspartyl protease inhibitors. Letters in Drug Design & Discovery, v.5, n.3, Apr, p.178-181. 2008.

Cunico, W. C., S.A.; Gomes, Crb.; Marques, Gh. Fármacos antimalariais- história e perspectivas. Rev. Bras. Farm., v. 89(1), p.49-55. 2008.

Davis, M. E. e M. E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. Nature Reviews Drug Discovery, v.3, n.12, Dec, p.1023-1035. 2004.

De Paula, E. E. B., F. B. De Sousa, *et al.* Insights into the multi-equilibrium, superstructure system based on beta-cyclodextrin and a highly water soluble guest. International Journal of Pharmaceutics, v.439, n.1-2, Dec, p.207-215. 2012.

De Sa, M. S., J. F. O. Costa, *et al.* Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives in vitro against Plasmodium falciparum and in vivo in P-berghei-infected mice. Parasitology Research, v.105, n.1, Jul, p.275-279. 2009.

De Sousa, F. B., A. M. L. Denadai, *et al.* Structural and physical-chemical evaluation of Bradykinin Potentiating Peptide and its high soluble supramolecular complex. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.67, n.3-4, Aug, p.407-422. 2010.

De Sousa, F. B., A. M. L. Denadai, *et al.* Supramolecular complex of fluoxetine with beta-cyclodextrin: An experimental and theoretical study. International Journal of Pharmaceutics, v.353, n.1-2, Apr, p.160-169. 2008.

De Sousa, F. B., A. M. L. Denadai, *et al.* Supramolecular self-assembly of cyclodextrin and higher water soluble guest: Thermodynamics and topological studies. Journal of the American Chemical Society, v.130, n.26, Jul, p.8426-8436. 2008.

De Sousa, F. B., A. C. Lima, *et al.* Superstructure based on beta-CD self-assembly induced by a small guest molecule. Physical Chemistry Chemical Physics, v.14, n.6, p.1934-1944. 2012.

De Souza, M. V. N. A tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Farmanguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. Rev. Virtual Quim., v.1, p.9-16. 2009.

Del Valle, E. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry, v.39, n.9, p.1033-1046. 2004.

Denadai, A. M. L., M. M. Santoro, *et al.* Self-assembly characterization of the beta-cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.55, n.1-2, Jun, p.41-49. 2006.

Denadai, A. M. L.. A supramolecular complex between proteinases and beta-cyclodextrin that preserves enzymatic activity - Physicochemical characterization. Biodrugs, v.20, n.5, p.283-291. 2006.

- Denadai, A. M. L., K. I. Teixeira, *et al.* Supramolecular self-assembly of beta-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. Carbohydrate Research, v.342, n.15, Nov, p.2286-2296. 2007.
- Desjeux, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.95, n.3, May-Jun, p.239-243. 2001.
- Dhulst, A., P. Augustijns, *et al.* Determination of artesunate by capillary electrophoresis with low UV detection and possible applications to analogues. Journal of Chromatographic Science, v.34, n.6, Jun, p.276-281. 1996.
- Diawara, H. Z., F. Gbaguidi, *et al.* Validation, transfer and measurement uncertainty estimation of an HPLC-UV method for the quantification of artemisinin in hydro alcoholic extracts of *Artemisia annua* L. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.56, n.1, Aug, p.7-15. 2011.
- Docampo, R. e S. N. J. Moreno. Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. Parasitology Research, v.90, Jun, p.S10-S13. 2003.
- Dong, J. X., Z. D. Qi, *et al.* Standard molar enthalpies of formation and thermal stabilities of artemisinin and its two derivatives: Artemether and artesunate. Journal of Chemical and Engineering Data, v.52, n.3, May, p.1045-1049. 2007.
- Dong, Y. X., J. Chollet, *et al.* Spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes as antimalarial peroxides: Charting a workable structure-activity relationship using simple prototypes. Journal of Medicinal Chemistry, v.48, n.15, Jul, p.4953-4961. 2005.
- Dorlo, T. P. C. e P. A. Kager. Pentamidine Dosage: A Base/Salt Confusion. Plos Neglected Tropical Diseases, v.2, n.5, May. 2008.
- Duan, M. S., N. Zhao, *et al.* Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: Formation of aggregates and higher-order complexes. International Journal of Pharmaceutics, v.297, n.1-2, Jun, p.213-222. 2005.
- Egyed, O. Spectroscopic Studies on Beta-Cyclodextrin. Vibrational Spectroscopy, v.1, n.2, Dec, p.225-227. 1990.
- Ellis, G. L., R. Amewu, *et al.* Two-step synthesis of achiral dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes with outstanding antimalarial activity, low toxicity, and high-stability profiles. Journal of Medicinal Chemistry, v.51, n.7, Apr, p.2170-2177. 2008.
- Fan, Z., C. H. Diao, *et al.* An investigation of the inclusion complex of beta-cyclodextrin with 8-nitro-quinoline in the solid state. Supramolecular Chemistry, v.18, n.1, Jan, p.7-11. 2006.
- Farag, A. M., A. S. Mayhoub, *et al.* Synthesis of new N-phenylpyrazole derivatives with potent antimicrobial activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.16, n.8, Apr, p.4569-4578. 2008.

- Fattorusso, C., G. Campiani, *et al.* Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of 4-quinolinyl- and 9-acrydinyldrazones as potent antimalarial agents. Journal of Medicinal Chemistry, v.51, n.5, Mar, p.1333-1343. 2008.
- Fraceto, L. F., M. M. Goncalves, *et al.* Characterization of the inclusion complex ropivacaine: beta-cyclodextrin. Quimica Nova, v.30, n.5, Sep-Oct, p.1203-1207. 2007.
- Franck, X., A. Fournet, *et al.* Biological evaluation of substituted quinolines. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.14, n.14, Jul, p.3635-3638. 2004.
- Freire, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? Drug Discovery Today, v.13, n.19-20, Oct, p.869-874. 2008.
- Freire, E., O. L. Mayorga, *et al.* Isothermal Titration Calorimetry. Analytical Chemistry, v.62, n.18, Sep, p.A950-A959. 1990.
- Freyer, M. W. e E. A. Lewis. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions METHODS IN CELL BIOLOGY, Department of Chemistry and Biochemistry Northern Arizona University Flagstaff, Arizona v.84. 2008.
- Gabriels, M., M. Jimidar, *et al.* Detection and separation of artesunate and artemisinic acid with capillary zone electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.21, n.1, Oct, p.193-198. 1999.
- Gabriels, M. e J. Plaizier-Vercammen. Physical and chemical evaluation of liposomes, containing artesunate. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.31, n.4, Mar, p.655-667. 2003.
- Gabriels, M. e J. Plaizier-Vercammen. Experimental designed optimisation and stability evaluation of dry suspensions with artemisinin derivatives for paediatric use. International Journal of Pharmaceutics, v.283, n.1-2, Sep, p.19-34. 2004.
- Gaisford, S. e M. A. A. O'neill. Pharmaceutical Isothermal Calorimetry Informa Healthcare USA - The School of Pharmacy University of London, U.K.; 2007.
- Gaudin, K., T. Kauss, *et al.* Determination of artesunate using reversed-phase HPLC at increased temperature and ELSD detection. Journal of Separation Science, v.32, n.2, Jan, p.231-237. 2009.
- Gaudin, K., M. H. Langlois, *et al.* Stability of artesunate in pharmaceutical solvents. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.43, n.3, Feb, p.1019-1024. 2007.
- Gibaud, S., S. Ben Zirar, *et al.* Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes. International Journal of Pharmaceutics, v.306, n.1-2, Dec, p.107-121. 2005.
- Goldberg, M. e I. Gomez-Orellana. Challenges for the oral delivery of macromolecules. Nature Reviews Drug Discovery, v.2, n.4, Apr, p.289-295. 2003.

Gonzalez-Gaitano, G., P. Rodriguez, *et al.* The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.44, n.1-4, Dec, p.101-105. 2002.

Goodman, L. S. e A. Gilman. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica.*, v.Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill. 1996.

Gossage, S. A., M. E. Rogers, *et al.* Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. International Journal for Parasitology, v.33, n.10, Sep, p.1027-1034. 2003.

Greef, T. F. A. e E. W. Meijer. Materials science - Supramolecular polymers. Nature, v.453, n.7192, May, p.171-173. 2008.

Green, M. D., D. L. Mount, *et al.* A colorimetric field method to assess the authenticity of drugs sold as the antimalarial artesunate. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.24, n.1, Dec, p.65-70. 2000.

Green, M. D., H. Nettey, *et al.* Use of refractometry and colorimetry as field methods to rapidly assess antimalarial drug quality. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.43, n.1, Jan, p.105-110. 2007.

Greenwood, B. e T. Mutabingwa. Malaria in 2002. Nature, v.415, n.6872, Feb, p.670-672. 2002.

Griesbeck, A. G. e T. T. El-Idreesy. En route to improved antimalarial peroxides following the natural role model artemisinin. Journal of the Chinese Chemical Society, v.53, n.6, Dec, p.1469-1476. 2006.

Griesbeck, A. G., T. T. El-Idreesy, *et al.* Photooxygenation in polymer matrices: En route to highly active antimalarial peroxides. Pure and Applied Chemistry, v.77, n.6, Jun, p.1059-1074. 2005.

Grillo, R., N. F. S. Melo, *et al.* Hydroxymethylnitrofurazone:Dimethyl-beta-cyclodextrin Inclusion Complex: A Physical-Chemistry Characterization. Journal of Biological Physics, v.33, n.5-6, Dec, p.445-453. 2007.

Groll, A. H., V. Petraitis, *et al.* Safety and efficacy of multilamellar liposomal nystatin against disseminated candidiasis in persistently neutropenic rabbits. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.43, n.10, Oct, p.2463-2467. 1999.

Guerrero-Martinez, A., G. Gonzalez-Gaitano, *et al.* Inclusion complexes between beta-cyclodextrin and a gemini surfactant in aqueous solution: An NMR study. Journal of Physical Chemistry B, v.110, n.28, Jul, p.13819-13828. 2006.

Guerrero-Martinez, A., M. A. Palafox, *et al.* Unexpected binding mode of gemini surfactants and gamma-cyclodextrin: DOSY as a tool for the study of complexation. Chemical Physics Letters, v.432, n.4-6, Dec, p.486-490. 2006.

Hardman, J. G. L., L. E. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* . p.1647. 2003.

Haynes, R. K., C. M. Ho-Wai, *et al.* Artesunate and dihydroartemisinin (DHA): Unusual decomposition products formed under mild conditions and comments on the fitness of DHA as an antimalarial drug. Chemmedchem, v.2, n.10, Oct, p.1448-1463. 2007.

Haynes, R. K. e S. Krishna. Artemisinins: activities and actions. Microbes and Infection, v.6, n.14, Nov, p.1339-1346. 2004.

He, Y. F., P. Fu, *et al.* Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. Micron, v.39, n.5, Jul, p.495-516. 2008.

Hedges, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. Chemical Reviews, v.98, n.5, Jul-Aug, p.2035-2044. 1998.

Heinz, L. D. R. J., U.: Verfahren zur Herstellung von Thiosemicarbaziden. patente DE1174780 (B). 1964.

Higuchi, T. e K. A. Connors. Phase-solubility Techniques. Adv. Anal. Chem. Instrum., v.4, p.117-212. 1965.

[http://apps.webofknowledge.com/summary.do?SID=4FCINnJ4P1dIMadijGp&product=WOS&qid=24&search\\_mode=GeneralSearch](http://apps.webofknowledge.com/summary.do?SID=4FCINnJ4P1dIMadijGp&product=WOS&qid=24&search_mode=GeneralSearch) (acesso em 22/05/2013).

<http://www.authorstream.com/Presentation/aakrutisanjeev-537640-dihydroartemisinin/> acesso em 13 de fevereiro de 2013.

[http://www.quimica.com.br/quimica/index.php?sessao=reportagem&id=860&codigo\\_revis=505](http://www.quimica.com.br/quimica/index.php?sessao=reportagem&id=860&codigo_revis=505) -acesso em 22 de fevereiro de 2013

[http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/ls\\_lc.html](http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/ls_lc.html) (acesso em 24 de março de 2013).

Illapakurthy, A. C., Y. A. Sabnis, *et al.* Interaction of artemisinin and its related compounds with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in solution state: Experimental and molecular-modeling studies. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.92, n.3, Mar, p.649-655. 2003.

Ingram, K., I. A. Yaremenko, *et al.* Identification of Antischistosomal Leads by Evaluating Bridged 1,2,4,5-Tetraoxanes, Alhapheroxides, and Tricyclic Monoperoxides. Journal of Medicinal Chemistry, v.55, n.20, Oct, p.8700-8711. 2012.

Irie, T. e K. Uekama. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .3. Toxicological issues and safety evaluation. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.86, n.2, Feb, p.147-162. 1997.

Jain, M., S. I. Khan, *et al.* Synthesis, antimalarial, antileishmanial, and antimicrobial activities of some 8-quinolinamine analogues. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.13, n.14, Jul, p.4458-4466. 2005.

Jarak, I., M. Marjanovic, *et al.* Novel pentamidine derivatives: Synthesis, anti-tumor properties and polynucleotide-binding activities. European Journal of Medicinal Chemistry, v.46, n.7, Jul, p.2807-2815. 2011.

Jin, H. X., Q. Zhang, *et al.* Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of spiroperoxides. Tetrahedron, v.62, n.33, Aug, p.7699-7711. 2006.

Ju, X. J., L. Y. Chu, *et al.* A novel thermoresponsive hydrogel with ion-recognition property through supramolecular host-guest complexation. Journal of Physical Chemistry B, v.112, n.4, Jan, p.1112-1118. 2008.

Ju, X. J., L. Y. Chu, *et al.* Synthesis and characterization of a novel thermo-sensitive copolymer of N-isopropylacrylamide and dibenzo-18-crown-6-diacrylamide. Macromolecular Rapid Communications, v.27, n.24, Dec, p.2072-2077. 2006.

Jullian, C., S. Miranda, *et al.* Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.15, n.9, May, p.3217-3224. 2007.

Kamphorst, A. O., I. M. De Sa, *et al.* Association complexes between ovalbumin and cyclodextrins have no effect on the immunological properties of ovalbumin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.57, n.2, Mar, p.199-205. 2004.

Karbwang, J., K. N. Bangchang, *et al.* Comparison of Oral Artemether and Mefloquine in Acute Uncomplicated Falciparum-Malaria. Lancet, v.340, n.8830, Nov, p.1245-1248. 1992.

Keshk, E. M., S. I. El-Desoky, *et al.* Synthesis and reactions of some new quinoline thiosemicarbazide derivatives of potential biological activity. Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements, v.183, n.6, p.1323-1343. 2008.

Khalil, S. M., G. G. Mohamed, *et al.* Spectrophotometric determination of chloroquine and pyrimethamine through ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate. Microchemical Journal, v.64, n.2, Apr, p.181-186. 2000.

Klayman, D. L. Qinghaosu (Artemisinin) - an Antimalarial Drug from China. Science, v.228, n.4703, p.1049-1055. 1985.

Koufman, J. A. e N. Johnston. Potential Benefits of pH 8.8 Alkaline Drinking Water as an Adjunct in the Treatment of Reflux Disease. Annals of Otology Rhinology and Laryngology, v.121, n.7, Jul, p.431-434. 2012.

Ladbury, J. E. e M. L. Doyle. Biocalorimetry II : applications of calorimetry in the biological sciences John Wiley & Sons Ltd., 2004.

Lafont, V., A. A. Armstrong, *et al.* Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. Chemical Biology & Drug Design, v.69, n.6, Jun, p.413-422. 2007.

Lehn, J. M. Design of organic complexing agents Strategies towards properties. . Structure & Bonding, v.16, n.1, p.1-69. 1973.

Lehn, J. M. Cryptates: inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules. Pure and Applied Chemistry, v.50, , n.9-10, p.871-892

1978.

Lehn, J. M. Supramolecular Chemistry - Receptors, Catalysts, and Carriers. Science, v.227, n.4689, p.849-856. 1985.

Lehn, J. M. Toward self-organization and complex matter. Science, v.295, n.5564, Mar, p.2400-2403. 2002.

Leslie, M. INFECTIOUS DISEASES Drug Developers Finally Take Aim At a Neglected Disease. Science, v.333, n.6045, Aug, p.933-935. 2011.

Li, G. L., Y. A. Gao, *et al.* Aggregation behavior of N-alkyl perfluorooctanesulfonamides in dimethyl sulfoxide solution. Journal of Colloid and Interface Science, v.342, n.2, Feb, p.372-381. 2010.

Li, Q. G., J. O. Peggins, *et al.* The pharmacokinetics and bioavailability of dihydroartemisinin, arteether, artemether, artesunic acid and artelinic acid in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.50, n.2, Feb, p.173-182. 1998.

Li, Y., H. D. Hao, *et al.* Simple Analogues of Qinghaosu (Artemisinin). Chemistry-an Asian Journal, v.7, n.8, Aug, p.1881-1886. 2012.

Lindegardh, N., A. M. Dondorp, *et al.* Validation and application of a liquid chromatographic-mass spectrometric method for determination of artesunate in pharmaceutical samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.45, n.1, Sep, p.149-153. 2007.

Liu, Y., Y. W. Yang, *et al.* Molecular recognition thermodynamics and structural elucidation of interactions between steroids and bridged bis(beta-cyclodextrin)s. Journal of Organic Chemistry, v.69, n.20, Oct, p.6590-6602. 2004.

Loftson T., M. M. Cyclodextrin in topic drug formulations: theory and practice. International Journal of Pharmaceutics, v.225, p.15-30. 2001.

Loftsson, T. e M. E. Brewster. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.85, n.10, Oct, p.1017-1025. 1996.

Loftsson, T. e D. Duchene. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics, v.329, n.1-2, Feb, p.1-11. 2007.

Lula, I., F. B. De Sousa, *et al.* Study of the BPP7a Peptide and its beta-Cyclodextrin Complex: Physicochemical Characterization and Complete Sequence Specific NMR

Assignments. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.22, n.9, Sep, p.1765-1773. 2011.

Lula, I., A. L. Denadai, *et al.* Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its beta-cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. Peptides, v.28, n.11, Nov, p.2199-2210. 2007.

Lula, I., M. F. Gomes, *et al.* Spironolactone and its complexes with beta-cyclodextrin: Modern NMR characterization and structural DFTB-SCC calculations. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.56, n.3-4, Dec, p.293-302. 2006.

Lyra, M. A. M., L. D. S. Alves, *et al.* Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.31(2), p.117-124. 2010.

Macdonald, J. C., T. J. M. Luo, *et al.* Supramolecular behavior of an isomorphous series of five bis(2-methylimidazolium 2,6-dicarboxypyridine) M(II) complexes. Crystal Growth & Design, v.4, n.6, Nov-Dec, p.1203-1209. 2004.

Magueur, G., B. Crousse, *et al.* Fluoroartemisinin: Trifluoromethyl analogues of artemether and artesunate. Journal of Medicinal Chemistry, v.47, n.10, May, p.2694-2699. 2004.

Manfredi, R., G. Marinacci, *et al.* Diffuse cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis during human immunodeficiency virus (HIV) infection, despite negligible immunodeficiency: repeated failure of liposomal amphotericin B administration, followed by successful long-term pentamidine and paromomycin administration. International Journal of Antimicrobial Agents, v.31, n.6, Jun, p.590-592. 2008.

Marques, F. D. F., A. J.; Sinisterra, R. D. M.; Jacoby, B. A.; Sousa, F. B.; Caliari, M. V.; Silva, G. A. B.; Melo, M. B.; Nadu, A. P.; Souza, L. E.; Irigoyen, M. C. C.; Almeida, A. P.; Santos, R. A. S. Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in. Hypertension, v.57, n.3, p.477-U261. 2011.

Martinez, A., C. S. K. Rajapakse, *et al.* The mechanism of antimalarial action of the ruthenium(II)-chloroquine complex [RuCl(2)(CQ)](2). Journal of Biological Inorganic Chemistry, v.13, n.5, Jun, p.703-712. 2008.

Martino, R., M. Malet-Martino, *et al.* Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.398, n.1, Sep, p.77-92. 2010.

Matioli, G. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais., v.Ed. UEM: Maringá. 2000.

Meshnick, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. International Journal for Parasitology, v.32, n.13, Dec, p.1655-1660. 2002.

- Messner, M., S. V. Kurkov, *et al.* Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, v.387, n.1-2, Mar, p.199-208. 2010.
- Messori, L., F. Piccioli, *et al.* Spectrophotometric and ESI-MS/HPLC studies reveal a common mechanism for the reaction of various artemisinin analogues with hemin. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.13, n.22, Nov, p.4055-4057. 2003.
- Mishra, J., A. Saxena, *et al.* Chemotherapy of leishmaniasis: Past, present and future. Current Medicinal Chemistry, v.14, n.10, p.1153-1169. 2007.
- Murray, H. W., J. D. Berman, *et al.* Advances in leishmaniasis. Lancet, v.366, n.9496, Oct-Nov, p.1561-1577. 2005.
- Na-Bangchang, K., P. G. Bray, *et al.* Study on the biochemical basis of mefloquine resistant *Plasmodium falciparum*. Experimental Parasitology, v.117, n.2, Oct, p.141-148. 2007.
- Nacher, M., B. Carme, *et al.* Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v.95, n.4, Jun, p.331-336. 2001.
- Naik, H., D. J. Murry, *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy assay for determination of artesunate and dihydroartemisinin in human plasma. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.816, n.1-2, Feb, p.233-242. 2005.
- Nakajima, A. Effect of Ethanol on the Inclusion Complex-Formation between Beta-Cyclodextrin and Pyrene. Bulletin of the Chemical Society of Japan, v.57, n.4, p.1143-1144. 1984.
- Nakayama, H., P. M. Loiseau, *et al.* Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.49, n.12, Dec, p.4950-4956. 2005.
- Navaratnam, V., S. Ramanathan, *et al.* Tolerability and pharmacokinetics of non-fixed and fixed combinations of artesunate and amodiaquine in Malaysian healthy normal volunteers. European Journal of Clinical Pharmacology, v.65, n.8, Aug, p.809-821. 2009.
- Navarro, M., H. Perez, *et al.* Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases .3. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of the new gold-chloroquine complex [Au(PPh<sub>3</sub>)(CQ)]PF<sub>6</sub>. Journal of Medicinal Chemistry, v.40, n.12, Jun, p.1937-1939. 1997.
- Navarro, M., F. Vasquez, *et al.* Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 7. Synthesis and in vitro antimalarial activity of new gold-chloroquine complexes. Journal of Medicinal Chemistry, v.47, n.21, Oct, p.5204-5209. 2004.

Newton, P., S. Proux, *et al.* Fake artesunate in southeast Asia. Lancet, v.357, n.9272, Jun, p.1948-1950. 2001.

Noronha, E. A., M.G.; Adolfo, G.; Romero, S.; Macêdo, V.; . Resistência à mefloquina do tipo RIII em crianças com malária falciparum em Manaus, AM- Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.33, n.2, p.201-205. 2000.

Novato, W. T. G., W. B. De Almeida, *et al.* A new topological parameter for monitoring subtle aggregation events in host-guest inclusion processes. Chemical Physics Letters, v.524, Feb, p.100-106. 2012.

Nyadong, L., G. A. Harris, *et al.* Combining Two-Dimensional Diffusion-Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Imaging Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry, and Direct Analysis in Real-Time Mass Spectrometry for the Integral Investigation of Counterfeit Pharmaceuticals. Analytical Chemistry, v.81, n.12, Jun, p.4803-4812. 2009.

Oliveira R.S.; Maciel, J. N. Aspectos socioeconômicos da Leishmaniose visceral em João Pessoa Paraíba – Brasil. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, João Pessoa, v.7, n.1, p.63-70. 2003.

Orengo, C. A., J. E. Bray, *et al.* The CATH protein family database: A resource for structural and functional annotation of genomes. Proteomics, v.2, n.1, Jan, p.11-21. 2002.

Ostergaard, J. e N. H. H. Heegaard. Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. Electrophoresis, v.24, n.17, Sep, p.2903-2913. 2003.

Passos, J. J., F. B. De Sousa, *et al.* Multi-equilibrium system based on sertraline and beta-cyclodextrin supramolecular complex in aqueous solution. International Journal of Pharmaceutics, v.421, n.1, Dec, p.24-33. 2011.

Passos, J. J., F. B. De Sousa, *et al.* In vivo evaluation of the highly soluble oral beta-cyclodextrin-Sertraline supramolecular complexes. International Journal of Pharmaceutics, v.436, n.1-2, Oct, p.478-485. 2012.

Passos, J. J., De Sousa, F.B., Lula, I.S., Barreto, E.A.,; Lopes, J. F., De Almeida, W.B., Sinisterra, R.D. Multi-Equilibrium System Based on Sertraline and -cyclodextrin Supramolecular Complex in Aqueous Solution. International Journal of Pharmaceutics. 2011.

Paul, M., R. Durand, *et al.* Physicochemical characteristics of pentamidine-loaded polymethacrylate nanoparticles: Implication in the intracellular drug release in Leishmania major infected mice. Journal of Drug Targeting, v.5, n.6, p.481-490. 1998.

Paul, M., H. Fessi, *et al.* Pentamidine-loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: physicochemical properties and stability work. International Journal of Pharmaceutics, v.159, n.2, Dec, p.223-232. 1997.

Peters, W. Drug resistance in malaria parasites of animals and man. In: (Ed.). Advances in Parasitology, Vol 41. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.41, 1998. Drug resistance in malaria parasites of animals and man, p.1-62. (Advances in Parasitology)

Phadke, M. U., V. K. Jadhav, *et al.* Simultaneous RP-LC Determination of Artesunate and Amodiaquine in Pharmaceutical Preparations. Chromatographia, v.68, n.11-12, Dec, p.1003-1007. 2008.

Pierce, M. M., C. S. Raman, *et al.* Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. Methods-a Companion to Methods in Enzymology, v.19, n.2, Oct, p.213-221. 1999.

Pinto, L. M. A., L. F. Fraceto, *et al.* Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.39, n.5, Oct, p.956-963. 2005.

Poola, N. R., M. Kalis, *et al.* Characterization of pentamidine excretion in the isolated perfused rat kidney. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.52, n.3, Sep, p.397-404. 2003.

Posner, G. H., W. Chang, *et al.* Curing malaria-infected rodents using artemisinin-derived trioxane dimers. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.75, n.5, Nov, p.153-153. 2006.

Posner, G. H., I. H. Paik, *et al.* Malaria-infected mice are cured by a single dose of novel artemisinin derivatives. Journal of Medicinal Chemistry, v.50, n.10, May, p.2516-2519. 2007.

Puckowska, A., K. Bielawski, *et al.* Aromatic analogues of DNA minor groove binders - synthesis and biological evaluation. European Journal of Medicinal Chemistry, v.39, n.1, Jan, p.99-105. 2004.

Rajewski, R. A. e V. J. Stella. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .2. In vivo drug delivery. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.85, n.11, Nov, p.1142-1169. 1996.

Rang, H. P. D., M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. Farmacologia. . Elsevier Editora Ltda., n.5 ed., p.904. 2004.

Ranher, S. S., S. V. Gandhi, *et al.* A validated HPLC method for determination of Artesunate in bulk and tablet formulation. Journal of Analytical Chemistry, v.65, n.5, May, p.507-510. 2010.

Rekharsky, M. V. e Y. Inoue. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. Chemical Reviews, v.98, n.5, Jul-Aug, p.1875-1917. 1998.

Robert, A., F. Benoit-Vical, *et al.* From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. Pure and Applied Chemistry, v.73, n.7, Jul, p.1173-1188. 2001.

Robert, A. e B. Meunier. Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin? Chemical Society Reviews, v.27, n.4, Jul, p.273-279. 1998.

Roth, W. R. e H. W. Lennartz. Heats of Hydrogenation .1. Heats of Hydrogenation by Isothermal Titration Calorimetry. Chemische Berichte-Recueil, v.113, n.5, p.1806-1817. 1980.

Salgm-Goksen, U., N. Gokhan-Kelekci, *et al.* 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: Synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.15, n.17, Sep, p.5738-5751. 2007.

Sanchezdelgado, R. A., M. Navarro, *et al.* Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases .2. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of new ruthenium- and rhodium-chloroquine complexes. Journal of Medicinal Chemistry, v.39, n.5, Mar, p.1095-1099. 1996.

Schlick, T. L., Z. B. Ding, *et al.* Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. Journal of the American Chemical Society, v.127, n.11, Mar, p.3718-3723. 2005.

Schneider, H. J., F. Hackett, *et al.* NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. Chemical Reviews, v.98, n.5, Jul-Aug, p.1755-1785. 1998.

Shriner, R. L. e F. W. Neumanw. The chemistry of the amidines. Chemistry Laboratory, Indiana University, Bloomington, Indiana 1944.

Siddiqui, R., A. Syed, *et al.* Effect of free versus liposomal-complexed pentamidine isethionate on biological characteristics of *Acanthamoeba castellanii* in vitro. Journal of Medical Microbiology, v.58, n.3, Mar, p.327-330. 2009.

Siegel, J. S. Supramolecular chemistry. Concepts and perspectives - Lehn, JM. Science, v.271, n.5251, Feb, p.949-949. 1996.

Silva, H. S. R. C. Antimaláricos potenciais: pró-fármacos poliméricos e formas de liberação controlada de artemisinina. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, p.209. 2006.

Silva, M. R. E., W. T. Beraldo, *et al.* Bradykinin, a Hypotensive and Smooth Muscle Stimulating Factor Released from Plasma Globulin by Snake Venoms and by Trypsin. American Journal of Physiology, v.156, n.2, p.261-273. 1949.

Silverstein, R. M., F. X. Webster. Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos. . editora LTC, sétima edição., 2005.

Silverstein, R. M., F. X. Webster, *et al.* Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos. editora LTC, sétima edição, p.191. 2005.

Singh, C., U. Sharma, *et al.* Orally active antimalarials: Synthesis and bioevaluation of a new series of steroid-based 1.2.4-trioxanes against multi-drug resistant malaria in mice. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.17, n.15, Aug, p.4097-4101. 2007.

- Siwek, A., P. Staczek, *et al.* Synthesis and structure-activity relationship studies of 4-arylthiosemicarbazides as topoisomerase IV inhibitors with Gram-positive antibacterial activity. Search for molecular basis of antibacterial activity of thiosemicarbazides. European Journal of Medicinal Chemistry, v.46, n.11, Nov, p.5717-5726. 2011.
- Siwek, A. e J. Stefanska. Antimicrobial Activity and SAR Study of Some Novel Thiosemicarbazide Derivatives Bearing Piperidine Moiety. Medicinal Chemistry, v.7, n.6, Nov, p.690-696. 2011.
- Siwek, A., J. Stefanska, *et al.* Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against *Candida* species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives. Journal of Molecular Modeling, v.18, n.9, Sep, p.4159-4170. 2012.
- Soares, A. F., R. De Albuquerque, *et al.* Oral administration of peptides and proteins: nanoparticles and cyclodextrins as biocompatible delivery systems. Nanomedicine, v.2, n.2, Apr, p.183-202. 2007.
- Soares, I. S. e M. M. Rodrigues. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.31, n.3, Mar, p.317-332. 1998.
- Stringham, R. W., K. G. Lynam, *et al.* High performance liquid chromatographic evaluation of artemisinin, raw material in the synthesis of artesunate and artemether. Journal of Chromatography A, v.1216, n.51, Dec, p.8918-8925. 2009.
- Sullivan, D. J., H. Matile, *et al.* A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. Journal of Biological Chemistry, v.273, n.47, Nov, p.31103-31107. 1998.
- Sundar, S. e H. W. Murray. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. Bulletin of the World Health Organization, v.83, n.5, May, p.394-395. 2005.
- Sunduru, N., K. Srivastava, *et al.* Synthesis of novel thiourea, thiazolidinedione and thioparabanic acid derivatives of 4-aminoquinoline as potent antimalarials. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.19, n.9, May, p.2570-2573. 2009.
- Sweetman, S. C. Dose adjustment in renal impairment - Response from Martindale: the Complete Drug Reference. British Medical Journal, v.331, n.7511, Jul, p.292-293. 2005.
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chemical Reviews, v.98, n.5, Jul-Aug, p.1743-1753. 1998.
- Szejtli, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure and Applied Chemistry, v.76, n.10, Oct, p.1825-1845. 2004.
- Tang, Y. Q., Y. X. Dong, *et al.* Weak base dispiro-1,2,4-trioxolanes: Potent antimalarial ozonides. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.17, n.5, Mar, p.1260-1265. 2007.

Taranto, A. G. C., J.W.M.; Araújo, M.T.; Silva, B.M.; . ESTUDOS SOBRE O MECANISMO DE AÇÃO DA ARTEMISININA E DOS ENDOPERÓXIDOS, A MAIS NOVA CLASSE DE AGENTES ANTIMALÁRICOS - PARTE I. Sitientibus, Feira de Santana, v.34, p.47-58. 2006.

Tavares, M. F. M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. Química Nova, v.20, n.5, Sep-Oct, p.493-511. 1997.

Teixeira, L. R., R. D. Sinisterra, *et al.* An inclusion compound of the anticonvulsant sodium valproate into alpha-cyclodextrin: Physico-chemical characterization. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.54, n.1-2, Feb, p.133-138. 2006.

Teja-Isavadharm, P., D. Siriyanonda, *et al.* A Simplified Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Assay for Artesunate and Dihydroartemisinin, Its Metabolite, in Human Plasma. Molecules, v.15, n.12, Dec, p.8747-8768. 2010.

Tekete, M., A. A. Djimde, *et al.* Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali. Malaria Journal, v.8, Feb. 2009.

Tenório, R. P. G., A.J.S.; TIOSSEMICARBAZONAS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, APLICAÇÕES SINTÉTICAS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA Química Nova, v.28, n.6, p.1030-1037. 2005.

Theeraladanon, C., M. Arisawa, *et al.* A novel synthesis of substituted quinolines using ring-closing metathesis (RCM): its application to the synthesis of key intermediates for anti-malarial agents. Tetrahedron, v.60, n.13, Mar, p.3017-3035. 2004.

Thomas, C. G., S. A. Ward, *et al.* Selective Determination, in Plasma, of Artemether and Its Major Metabolite, Dihydroartemisinin, by High-Performance Liquid-Chromatography with Ultraviolet Detection. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, v.583, n.1, Nov, p.131-136. 1992.

Turnbull, W. B. e A. H. Daranas. On the value of  $c$ : Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? Journal of the American Chemical Society, v.125, n.48, Dec, p.14859-14866. 2003.

Uccello-Barretta, G., F. Balzano, *et al.* Combined NMR-crystallographic and modelling investigation of the inclusion of molsidomine into alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.13, n.23, Dec, p.6502-6512. 2005.

Uekama, K., F. Hirayama, *et al.* Cyclodextrin drug carrier systems. Chemical Reviews, v.98, n.5, Jul-Aug, p.2045-2076. 1998.

Vale, N. M., R.; Gomes, P.; . Quimioterapia da malária- Um século no desenvolvimento de antimaláricos. Química Nova, v.099, p.61-73. 2005.

Valente, C. O. DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR A BASE DE HEMINA PARA ANÁLISE DE AMODIAQUINA EM LEITE MATERNO Dissertação- Universidade Federal de Sergipe 2010.

Van Agtmael, M. A., T. A. Eggelte, *et al.* Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. Trends in Pharmacological Sciences, v.20, n.5, May, p.199-205. 1999.

Veiga, F., J. J. C. Teixeiradas, *et al.* Inclusion complexation of tolbutamide with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. International Journal of Pharmaceutics, v.129, n.1-2, Mar, p.63-71. 1996.

Vennerstrom, J. L., S. Arbe-Barnes, *et al.* Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. Nature, v.430, n.7002, Aug, p.900-904. 2004.

Vieites, M., P. Smircich, *et al.* Potent in vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. Journal of Biological Inorganic Chemistry, v.13, n.5, Jun, p.723-735. 2008.

West, J. e D. M. Rodman. Gene therapy for pulmonary diseases. Chest, v.119, n.2, Feb, p.613-617. 2001.

White, N. J. Qinghaosu (Artemisinin): The price of success. Science, v.320, n.5874, Apr, p.330-334. 2008.

Wiseman, T., S. Williston, *et al.* Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. Analytical Biochemistry, v.179, n.1, May, p.131-137. 1989.

Witkowski, B., A. Berry, *et al.* Resistance to antimalarial compounds: Methods and applications. Drug Resistance Updates, v.12, n.1-2, Feb-Apr, p.42-50. 2009.

Wolday, D., N. Berhe, *et al.* Leishmania-HIV interaction: Immunopathogenic mechanisms. Parasitology Today, v.15, n.5, May, p.182-187. 1999.

Wood, D. J., F. E. Hruska, *et al.* H-1 Nmr-Study of Inclusion of Aromatic-Molecules in Alpha-Cyclodextrin. Journal of the American Chemical Society, v.99, n.6, p.1735-1740. 1977.

World Health Organization - Malaria. WHO, p.(<http://www.who.int/malaria/en/>). 2013.

World Health Organization, 2013.

Wu, G. D., H. J. Zhou, *et al.* Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by artesunate. Vascular Pharmacology, v.41, n.6, Jul, p.205-212. 2004.

Xiao, X. C., L. Y. Chu, *et al.* Positively thermo-sensitive monodisperse core-shell microspheres. Advanced Functional Materials, v.13, n.11, Nov, p.847-852. 2003.

Xiao, X. C., L. Y. Chu, *et al.* Preparation of submicrometer-sized monodispersed thermoresponsive core-shell hydrogel microspheres. Langmuir, v.20, n.13, Jun, p.5247-5253. 2004.

Xiao, X. C. e Z. G. Hong. Firstborn microcrystallization method to prepare nanocapsules containing artesunate. International Journal of Nanomedicine, v.5, p.483-486. 2010.

Yamada, T., T. Imai, *et al.* Inclusion complex of 3,9-bis(N,N-dimethylcarbamoyloxy)-5H-benzofuro[3,2-c]quinoline-6-one (KCA-098) with heptakis(2,6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin: Interaction and dissolution properties. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v.48, n.9, Sep, p.1264-1269. 2000.

Yang, B., J. Lin, *et al.* Artemether/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.17, n.17, Sep, p.6311-6317. 2009.

Yilmaz, V. T., A. Karadag, *et al.* Thermal-Decomposition of Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes of Ferrocene and Their Derivatives. Thermochimica Acta, v.261, Sep, p.107-118. 1995.

Zhu, Y. F., J. L. Shi, *et al.* Stimuli-responsive controlled drug release from a hollow mesoporous silica sphere/polyelectrolyte multilayer core-shell structure. Angewandte Chemie-International Edition, v.44, n.32, p.5083-5087. 2005.

Zolek, T. e D. Maciejewska. Theoretical models of pentamidine analogs activity based on their DNA minor groove complexes. European Journal of Medicinal Chemistry, v.45, n.5, May, p.1991-1999. 2010.

## **ANEXO I**