

Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

Melo, N.F.S.¹; Grillo, R.¹; Moraes, C.M.²; Brito, C.L.³; Trossini, G.H.G.³; Menezes, C.M.S.³; Ferreira, E.I.³; Rosa, A.H.¹; Fraceto, L.F.^{1,2*}

¹Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Sorocaba, SP, Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

³LAPEN, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil.

Recebido 01/02/07 / Aceito 03/09/07

RESUMO

Nitrofurazona (NF), 5-nitro-2-furaldeído semicarbazona, é um antibiótico de amplo espectro, que apresenta diversos efeitos tóxicos e baixa solubilidade aquosa. A complexação da NF com ciclodextrinas é de grande interesse para o desenvolvimento de uma formulação para este antibiótico que seja mais segura e eficiente. Neste trabalho foi realizada a preparação e caracterização inicial do complexo de inclusão entre NF e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) através de experimentos para determinação da cinética de complexação, medidas de fotoestabilidade, medidas de constante de afinidade fármaco: ciclodextrina, ensaios de liberação *in vitro*, estequiometria de formação do complexo e morfologia do complexo por microscopia eletrônica de varredura. Os ensaios de cinética de complexação mostram que para o complexo atingir o equilíbrio são necessárias 17,3h. As isotermas de solubilidade determinadas para a NF em função da temperatura mostraram perfis do tipo A e B indicando que a temperatura é um fator importante na complexação da NF com ciclodextrina. Os experimentos de fotoestabilidade indicam que a inserção da molécula de NF na cavidade interna da ciclodextrina protege o fármaco da fotodecomposição. A cinética de liberação mostra que o perfil de liberação do fármaco é modificado pela presença da ciclodextrina no meio. A estequiometria de complexação entre NF e HP- β -CD determinada foi de 1:1 NF:HP- β -CD. Os resultados de microscopia eletrônica de varredura indicam alterações na estrutura cristalina da NF em presença de ciclodextrina. Este estudo está baseado na caracterização físico-química da complexação entre NF e HP- β -CD podendo ser uma nova potencial opção para utilização terapêutica do NF.

Palavras-chave: nitrofurazona; ciclodextrina; complexo de inclusão.

INTRODUÇÃO

A nitrofurazona, 5-nitro-2-furaldeído semicarbazona (NF, Figura 1) é um composto derivado dos nitrofuranos com atividade antibacteriana contra microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Dodd & Stillman, 1944), sendo utilizado no tratamento de infecções tópicas e queimaduras de segundo e terceiro grau (Race et al., 2005; Nichols, 2004). É também utilizada em enxertos cutâneos onde ocorrem complicações por infecções bacterianas refratárias aos fármacos usuais escolhidos. Apresenta atividade antibacteriana no soro e no sangue e não interfere na cicatrização (Nichols, 2004). Entretanto, devido à sua alta toxicidade, foi excluído seu uso em infecções sistêmicas (Henderson et al., 1988)

Na literatura foi relatado também que a nitrofurazona é ativa contra o *Tripanossoma cruzi*, causando a inibição da enzima tripanotona redutase, sendo esta enzima encontrada apenas no parasita, mas não no hospedeiro (Gonçalves et al., 1994).

Fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos (Amidon et al., 1995). A solubilidade de um fármaco e seu comportamento em água é uma importante característica, porque a água é o principal constituinte de toda matéria viva. A solubilidade e a ionização de fármacos na água, juntamente com o coeficiente de partição dos fármacos entre a água e lipídios, influenciam a facilidade de passagem através de uma membrana celular, assim como transporte um fármaco desde sua via de administração até o seu sítio de ação (Thomas, 2003).

* Autor para correspondência: Leonardo Fernandes Fraceto - Departamento de Engenharia Ambiental - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Av. Três de Março, 511 - Alto da Boa Vista - CEP: 18087-180 - Sorocaba - SP, Brasil - Telefone: (15) 3238-3414 - Fax: (15) 3238-4013 - E-mail: leonardo@sorocaba.unesp.br

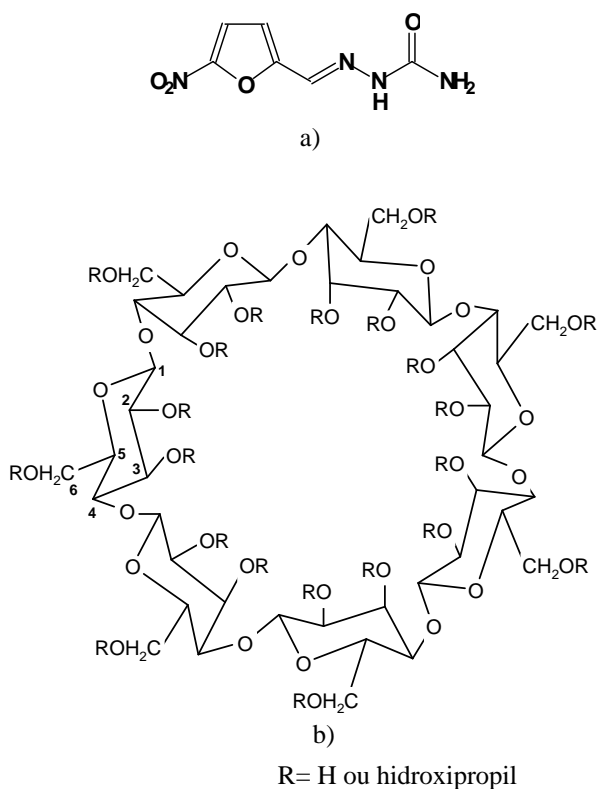


Figura 1. Estrutura química da NF e representação esquemática da HP- β -CD.

A complexação de fármacos com ciclodextrinas faz com que as propriedades físico-químicas destes mudem, podendo aumentar a solubilidade em água, estabilidade química e a sua biodisponibilidade (McCormack & Gregoriadis, 1998; Matioli, 2000). A complexação de alguns fármacos com baixa solubilidade ocorre com as ciclodextrinas devido às características que estas moléculas de ciclodextrinas possuem. As ciclodextrinas (Figura 1) são produtos cíclicos obtidos da hidrólise enzimática do amido por alguns microrganismos (Matioli, 2000) e apresentam uma cavidade interna com caráter hidrofóbico (apolar) o que faz com que compostos orgânicos com baixa solubilidade possam interagir com esta cavidade aumentando sua solubilidade. As β -CDs são as ciclodextrinas mais amplamente utilizadas na complexação com várias classes de fármacos (Irie & Uekama, 1997; Loftsson & Masson, 2001).

No entanto, a administração parenteral das CDs e, particularmente da β -CD, pode causar nefrotoxicidade devido à formação de um complexo de baixa solubilidade entre β -CD e colesterol, que precipita e impede a filtração glomerular, nos rins (Irie & Uekama, 1997). A administração de β -CD também pode causar hemólise de eritrócitos humanos. Por isso, foram desenvolvidas ciclodextrinas modificadas, de forma a melhorar as propriedades de carregamento e diminuir os efeitos tóxicos intrínsecos da β -CD. Como exemplo destes derivados sintéticos das ciclodextrinas naturais, pode-se citar a 2-hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), o 2,6-dimetil- β -ciclodextrina e o sulfobutiléter de -ciclodextrina (Matioli, 2000).

Neste estudo foi realizada a preparação e caracterização inicial do complexo de inclusão entre a NF e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) através de experimentos para determinação da cinética de complexação, medidas de fotoestabilidade, constante de afinidade fármaco:ciclodextrina, ensaios de liberação *in vitro*, estequiometria de formação do complexo e microscopia eletrônica de varredura. Contribui para a literatura, pois propõe a possibilidade de utilização de um novo sistema carreador para a NF podendo potencializar a sua utilização futura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A NF foi obtida da Sigma Chem. Co. A HP- β -CD foi obtida por doação da Roquette. A acetonitrila foi obtida da Merck com padrão para cromatografia líquida de alta eficiência. A água utilizada nos experimentos foi deionizada.

Cinética de complexação

Para a avaliação da cinética de formação do complexo, dissolveu-se quantidades de NF (35 μ M) e HP- β -CD em água (1:1 razão molar) e submeteu-se à agitação magnética (150h), em temperatura ambiente. Posteriormente, alíquotas foram retiradas e analisadas por espectrofotometria no comprimento de máxima absorção do fármaco (365nm) até atingir o equilíbrio (150 h, medindo em intervalos de 30 minutos nas primeiras horas e de 12 horas nas subsequentes). Foi acompanhado também a absorvância de uma solução de mesma concentração da NF (35 μ M) sem ciclodextrina como padrão para comparação. Os valores de absorvância foram normalizados ($A_{\text{Normalizada}} = At/A_0$, onde At =absorvância em um determinado tempo e A_0 =absorvância no tempo zero).

A análise dos dados cinéticos foi realizada utilizando o software Sigma Plot® versão 8.0 a partir do melhor ajuste obtido através da exponencial simples descrita na Equação 1.

$$A = A_0 + a.(1 - e^{-\frac{t}{k}}) \quad (1)$$

Onde A representa a absorvância normalizada, A_0 representa a absorvância inicial, t o tempo em horas, a é coeficiente da equação e k a constante cinética.

Preparo do complexo de inclusão por co-solubilização

O complexo de inclusão entre NF e HP- β -CD foi preparado pelo procedimento descrito por Azevedo et al. (2000). Neste procedimento, uma solução contendo NF foi preparada utilizando acetona como solvente (devido ao fármaco apresentar uma maior solubilidade neste solvente) e uma solução de HP- β -CD preparada em água, ambas em

mesmas razões molares (1:1, NF:ciclodextrina). Estas soluções foram deixadas sob agitação até completa dissolução das substâncias, sendo em seguida misturadas e deixadas sob agitação. Após completa dissolução, a solução final foi levada ao evaporador rotativo para evaporação dos solventes, sendo o sólido resultante dissolvido em água e posterior liofilização, sendo armazenada em dessecador com sílica para posterior utilização.

Isotermas de solubilidade

Os estudos de solubilidade foram realizados de acordo com o método descrito na literatura por Connors (Connors, 1997). Adicionou-se excesso de NF em água e acrescentou-se quantidades crescentes de HP- β -CD (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mM), as suspensões contendo fármaco.

As soluções foram submetidas à agitação até atingir o equilíbrio (32 h, tempo definido pelos experimentos de cinética de complexação) sendo centrifugadas por 15 minutos à 280g, para retirada do excesso de NF não solubilizado. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e filtradas em membranas de 0,22 μ m, medindo-se a absorbância (em 365nm).

Foi utilizada para análise quantitativa do NF a curva analítica determinada espectrofotometricamente (Absorbância=14,81[NFOH] + 0,00105, $r = 0,9998$). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A partir dos dados, obteve-se isotermas de solubilidade (concentração de NF vs concentração de HP- β -CD) e mediu-se a constante de afinidade (K) utilizando a Equação 2 (Connors, 1997).

$$K = \frac{\text{inclinação}}{S_o \cdot (1 - \text{inclinação})} \quad (2)$$

Onde S_o é a solubilidade intrínseca do fármaco em solução.

Ensaio de Fotoestabilidade

O estudo de fotoestabilidade foi realizado para a NF e complexo de NF:HP- β -CD na razão molar de 1:1 (fármaco:ciclodextrina). Os experimentos foram realizados com a luz solar, sobre as mesmas condições (de intensidade de luminosidade) em um dia claro e sem nuvens no céu.

Foi realizado também o mesmo estudo utilizando como fonte de luz uma lâmpada UV modelo UVGL-58 Mineralight Lamp (254nm) dentro de uma câmara de dimensões 20cm x 27cm x 23cm, sendo a amostra irradiada a 18cm de distância da lâmpada.

O ensaio de fotoestabilidade foi realizado expondo 10mL de fármaco (35 μ M) e complexo (35 μ M), em placas de petri cobertas com filme plástico (para evitar perda por evaporação) à mesma taxa de radiação (solar ou da lâmpada de UV) a temperatura ambiente. Alíquotas foram retiradas

em intervalos de uma hora e analisadas por CLAE. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para quantificação do teor de fármaco foi utilizada a curva analítica determinada por CLAE (Área do pico = $1,09 \times 10^7$ [NF] + 40674,49, $r = 0,9998$).

As análises em CLAE foram realizadas utilizando o equipamento Shimadzu com Sistema controlador (Shimadzu SCL - 10VP), bombas A e B (Shimadzu LC - 10AD VP), degaseificador (Shimadzu DGU - 14A), detector UV-VIS (SPD - 10A VP), auto-injetor (Shimadzu SIL - 10AD VP), forno (Shimadzu CTO - 10AS) e os cromatogramas foram determinados através do programa Class - VP 6.12.

Foram utilizadas as seguintes condições analíticas: coluna Phenomenex, Gemini, C_{18} fase reversa, 5 μ 110A, 250 x 4,60mm; fluxo de 1,2mL min⁻¹, volume injetado da amostra de 20 μ L, comprimento de onda de 365nm, temperatura de 30 °C e fase móvel: acetonitrila/água (80/20) (v/v). Os cromatogramas foram analisados utilizando o software Class VP 6.12, apresentando um tempo de retenção para a NF de 4,3 min.

Testes de liberação *in vitro*

Nos testes de liberação foram utilizados sistemas de dois compartimentos, separados por membranas de celulose (Spectrapore) de poro para exclusão molecular de 1000 Da, que permitiram observar a liberação da NF livre e complexado, desde o compartimento doador (1mL) até o compartimento acceptor (80mL), contendo água deionizada, sob agitação leve (Paavola et al., 1995). Amostras do compartimento acceptor foram coletadas, durante oito horas, e a concentração de NF foi determinada por espectrofotometria em 365nm. A liberação modificada foi observada através do gráfico de %NF liberado em função do tempo (ver resultados abaixo). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A modelagem matemática dos dados (Sigma Plot® 8.0) foi usada para analisar os perfis de liberação do fármaco livre e dos complexos de inclusão. Foram utilizados os modelos monoexponencial (Equação 3) e biexponencial (Equação 4). A seleção do modelo foi baseada no melhor valor de coeficiente de correlação do ajuste da curva experimental para cada um dos dados.

$$C = a \cdot (1 - e^{-\frac{t}{k}}) \quad (3)$$

$$C = a \cdot (1 - e^{-\frac{t}{k_1}}) + b \cdot (1 - e^{-\frac{t}{k_2}}) \quad (4)$$

Onde C é a concentração (% de fármaco liberado), t é o tempo e k , k_1 e k_2 são as constantes cinéticas, a e b são coeficientes da equação.

Estequiometria de complexação

A técnica de variação contínua *Job plot* (Etos et al.,

1994; Loukas et al., 1998) se baseia na variação de um parâmetro físico-químico observado na presença de ciclodextrina e que pode ser medido por técnicas espectroscópicas, como RMN ou fluorescência. Esta técnica foi utilizada na determinação da estequiometria de complexos de inclusão envolvendo a β -CD (Ivanov et al., 1996; Laverde et al., 2002; Pinto et al., 2005).

A estequiometria de complexação foi determinada a partir de soluções equimolares de NF e HP- β -CD preparadas, misturadas e agitadas (por um período de 50 horas) de forma que a concentração total (M) permaneça constante ($M = [\text{NF}]_{\text{total}} + [\text{HP-}\beta\text{-CD}]_{\text{total}} = 50 \text{ M}$), variando-se a razão molar das espécies entre 0 e 1 (0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1,0). Como controles foram preparadas amostras de NF nas mesmas proporções molares porém sem a presença de ciclodextrina.

O parâmetro físico-químico analisado foi a variação de intensidade máxima de absorção da NF em 365nm. A análise dos dados foi realizada através da relação de variação de absorbância ($\Delta\text{Absorbância} = \{A_{\text{NFcomplexo}} - A_{\text{NFlivre}}\}$) em função da razão molar de NF r_{NF} ($r_{\text{NF}} = [\text{NF}]_{\text{total}} / \{[\text{NF}]_{\text{total}} + [\text{HP-}\beta\text{-CD}]_{\text{total}}\}$) em função de r_{NF} , onde para um dado valor de r , a concentração do complexo fármaco:ciclodextrina atingirá um máximo correspondente ao ponto onde a derivada $d[\text{fármaco:ciclodextrina}]/dr = 0$.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de microscopia eletrônica foi utilizada para analisar diretamente a estrutura e a distribuição dos cristais formados pelas amostras de NF, HP- β -CD, mistura física (NF+HP- β -CD) e complexo de inclusão NF:HP- β -CD (1:1 razão molar). Esta técnica permitiu a avaliação de variações estruturais nos cristais das moléculas de NF e HP- β -CD. As amostras foram adicionadas à lâminas de vidro, fixadas com fita dupla face e metalizadas com ouro coloidal por 30s, de forma a tornar o material eletricamente condutor. As lâminas foram fixadas em um suporte metálico, utilizando uma pasta condutora de carbono. As amostras metalizadas foram analisadas com um microscópio eletrônico de varredura JEOL J-210, pertencente ao Laboratório de Ótica, Instituto de Física/Unicamp.

RESULTADOS

Cinética de Complexação

A cinética de complexação do NF em HP- β -CD foi estudada pelo acompanhamento da variação no pico de absorção em 365nm da molécula de NF em função do tempo até que não se observasse variações (equilíbrio). A curva de cinética de complexação obtida para a NF pode ser observada na Figura 2. Nesta figura observa-se ainda um controle do fármaco em ausência de ciclodextrina a fim de comparação.

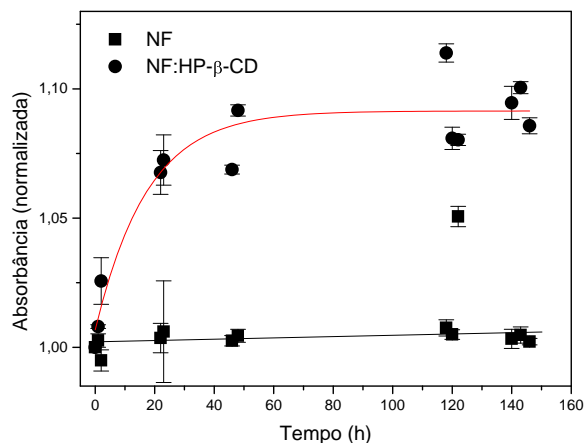


Figura 2. Curva de cinética de complexação da NF em presença de HP- β -CD, complexo razão molar 1:1, 25°C (n=3).

A partir da análise dos dados da Figura 2, observa-se que para o sistema fármaco:ciclodextrina houve um aumento na absorbância do sistema seguido de uma estabilização na variação da absorbância (equilíbrio), enquanto que a absorbância do fármaco livre em solução permaneceu constante em função do tempo, sugerindo assim, que o efeito observado para a variação na absorbância do NF em presença de ciclodextrina é devida a complexação do NF com a ciclodextrina.

A análise matemática da curva de cinética foi realizada utilizando o software Sigma Plot® versão 8.0. O melhor ajuste de curva foi obtido com o modelo matemático de uma monoexponencial (equação 1).

A cinética de complexação do NF com HP- β -CD apresenta-se de primeira ordem (ajuste monoexponencial), ou seja, a complexação depende principalmente da concentração de uma das espécies, sendo o valor da constante cinética determinada de $17,3 \pm 5,0 \text{ h}^{-1}$ ($r = 0,954$). O valor da constante cinética é importante para a realização dos demais experimentos, pois indicou em que momento o sistema atingiu o equilíbrio. O valor de constante cinética de complexação para o NF é bastante diferente de outras substâncias relatadas na literatura, como exemplo, anestésicos locais (lidocaína e bupivacaína), onde os valores das constantes cinéticas entre 1-5 h (Moraes et al., 2007), isto provavelmente devido a sua alta hidrofobicidade em comparação com estes compostos.

Isoterma de Solubilidade

A Figura 3 mostra as isotermas de solubilidade para a NF em presença de HP- β -CD em função da temperatura.

Nesta Figura, observa-se que a 20°C ocorre um aumento linear na solubilidade do fármaco em função do aumento da concentração de ciclodextrina, ou seja um diagrama do Tipo A. No entanto, acima de 20°C, os diagramas

de solubilidade do NF apresentam uma modificação no perfil. Deixam de ser do Tipo AL, passando para o Tipo B (Figura 3), onde o complexo formado passa a ser insolúvel (Másson et al., 1999).

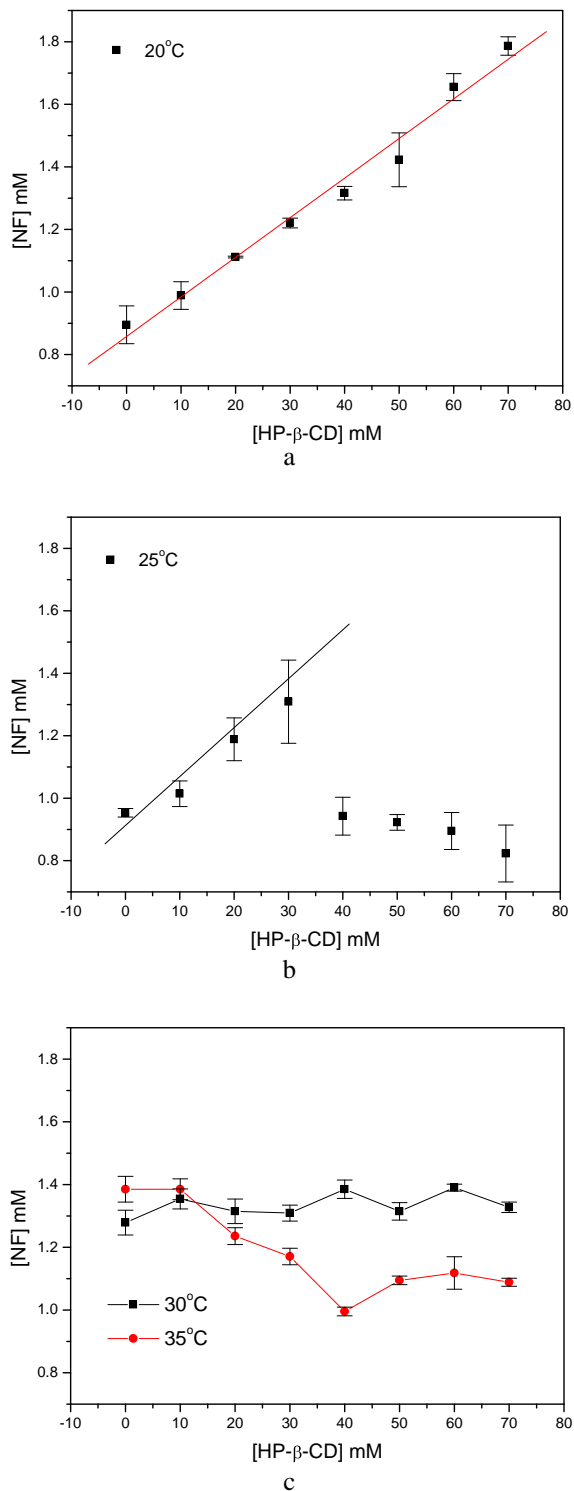


Figura 3. Diagrama de solubilidade de fases para a NF em presença de HP-β-CD, a) 20°C, b) 25°C e c) 30-35°C (n=3).

O valor da constante de afinidade entre NF e ciclodextrina foi determinada a partir da parte linear da Figura 3 e utilizando-se a Equação 2, sendo estes $14,9 \pm 2,3$ e $10,8 \pm 1,2$ M^{-1} a 20°C e 25°C respectivamente.

Ensaio de Fotoestabilidade

A fotoestabilidade de compostos fotossensíveis pode ser avaliada através da exposição destes a radiação ultravioleta (Chen et al., 1996; Mielcarek, 1994; Mielcarek & Daczowska, 1999; Bayomi et al., 2002; Pomponio et al., 2003; Yap et al., 2004) e à radiação solar (Bayomi et al., 2002).

Os métodos mais utilizados para determinação e quantificação da fotoestabilidade de fármacos são a espectrofotometria e a CLAE (Mielcarek, 1994; Chen et al., 1996; Mielcarek & Daczowska, 1999; Bayomi et al., 2002; Yap et al., 2004). Sendo assim, foi realizado um estudo de fotoestabilidade para a NF e seu complexo com HP-β-CD (1:1), a fim de avaliar a eficiência da complexação sobre a fotoestabilidade em duas situações de exposição: à radiação solar (Figura 4a) e com lâmpada de ultravioleta (Figura 4b).

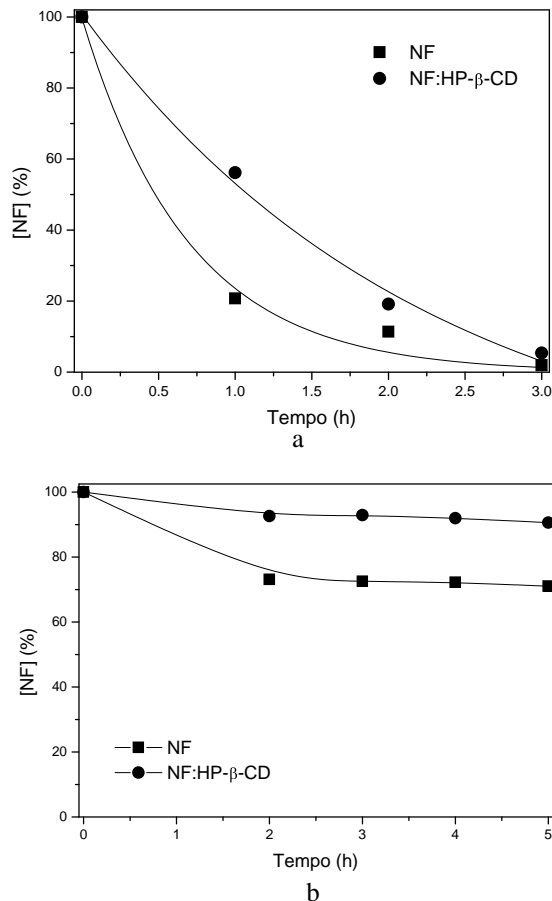


Figura 4. Fotoestabilidade da NF em ausência e presença de ciclodextrina (razão molar 1:1, NF:ciclodextrina) após exposição. a) luz solar e b) lâmpada de UV, 25°C, [NF] = 35 μ M (n=3).

As amostras (NF e complexo, 35 μM) foram submetidas à radiação e quantificadas por CLAE em função do tempo.

Alíquotas foram retiradas da exposição à radiação em intervalos de uma hora, analisadas por CLAE. A variação da concentração dos fármacos (em ausência e presença de ciclodextrina) em função do tempo está apresentada na Figura 4. Os valores de concentração foram convertidos em % de fármaco.

Na Figura 4 observa-se que a concentração de NF diminuiu em uma taxa de decomposição maior para o fármaco em ausência de ciclodextrina.

Ensaio de Liberação *in vitro*

A Figura 5 apresenta as curvas de porcentagem de liberação para a molécula de NF em presença e ausência de HP- β -CD em função do tempo (420 minutos, na temperatura ambiente).

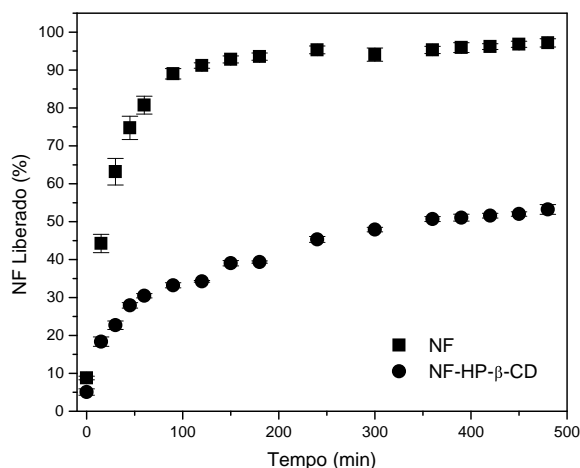


Figura 5. Cinética de liberação *in vitro* para a NF em ausência e presença de HP- β -CD (razão molar 1:1, NF:ciclodextrina), 25°C (n=3).

Pela análise das curvas se observa que a liberação total da NF (100%) em solução ocorreu após 200 min de diálise, em contraste com os resultados obtidos para a NF complexado, em que somente uma menor quantidade destes foram liberados no mesmo intervalo de tempo. A análise estatística da área sobre a curva dos dois conjuntos de dados foi realizada utilizando teste t não pareado (com correção de Welch) apresentando diferença entre as curvas ($p < 0,001$). Desta forma a presença de HP- β -CD no sistema retarda a liberação do composto NF, em comparação à solução controle.

A fim de investigar o comportamento cinético do perfil de liberação da NF (em presença e ausência de ciclodextrina), foram aplicados modelos matemáticos mono

e biexponencial nas curvas de liberação, a fim de calcular as constantes cinéticas de liberação. Para a NF a cinética de liberação determinada foi monoexponencial com uma constante cinética de liberação k de $27,62 \pm 1,60 \text{ min}^{-1}$ ($r=0,994$) enquanto que para o NF na presença de HP- β -CD, a cinética de liberação determinada foi biexponencial com valores de constante cinética k_1 e k_2 $11,70 \pm 3,79 \text{ min}^{-1}$ e $250,00 \pm 75,00 \text{ min}^{-1}$ respectivamente ($r=0,993$).

Estequiometria de complexação

A estequiometria para a complexação da NF em HP- β -CD foi obtida a partir do método de variação contínua (Connors, 1997) onde mediu-se a variação da intensidade máxima de absorvância do fármaco em solução em presença e ausência de ciclodextrina (Figura 6).

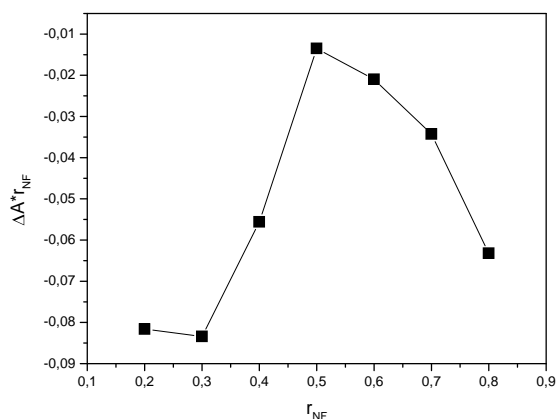


Figura 6. Método de variação contínua (Job Plot) para o complexo NF:HP- β -CD obtido por espectrofotometria, $[\text{NF}] + [\text{HP-}\beta\text{-CD}] = 50 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{absorção}} = 365\text{nm}$, 25°C.

Na Figura 6 observa-se que o máximo encontrado foi na r_{NF} igual a 0,5, o que indica que a complexação entre a molécula de NF e HP- β -CD possui estequiometria de 1:1, ou seja, uma molécula de NF para cada molécula de HP- β -CD.

Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises por MEV facilitaram a observação dos cristais das amostras isoladas (NF, HP- β -CD e mistura física) e do complexo de inclusão entre NF:HP- β -CD (Figura 7).

Na Figura 7 pode-se observar alterações nas estruturas cristalinas da NF e HP- β -CD quando comparadas as substâncias isoladas e da mistura física entre elas. Esta alteração indica que a interação de NF com HP- β -CD muda a estrutura cristalina, provavelmente devido a formação do complexo de inclusão (Moraes et al., 2007).

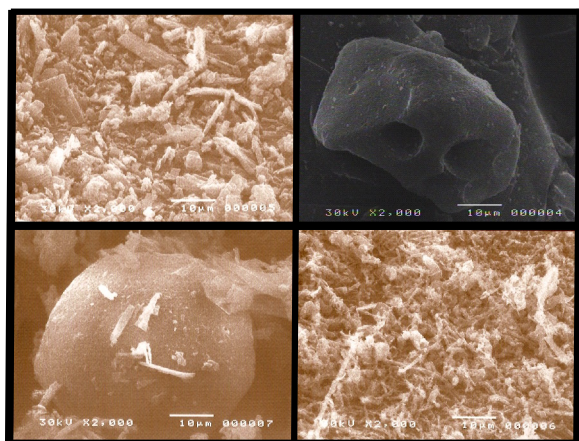


Figura 7. Análise por MEV dos cristais de (A) NF, (B) HP-β-CD, (C) mistura física NF e HP-β-CD e (D) complexo. Aumento de 2000x.

DISCUSSÃO

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com fármacos, alterando a intensidade e duração dos efeitos destes (Araújo et al., 2003). Em solução, há um equilíbrio entre as moléculas na forma de complexo e livres, podendo causar alterações no espectro de absorção de fármacos, deslocamentos ou aumento/diminuição do pico de absorção máximo, que muitas vezes, são similares aos efeitos causados por solventes com diferentes polaridades. Isso sugere que a molécula "hóspede" está sendo transferida de um meio polar para a cavidade apolar das ciclodextrinas (Paavola et al., 1995). A absorvância máxima em 365 nm da NF sofre um aumento quando em presença de HP-β-CD estabilizando em função do tempo. O valor da constante cinética foi determinado sendo $17,3 \pm 5,0 \text{ h}^{-1}$, ou seja, o equilíbrio deste sistema é atingido após este tempo.

Para a realização da caracterização do complexo de inclusão entre NF e HP-β-CD observou-se o comportamento da solubilidade do fármaco em função da temperatura (Figura 3). Para complexos de inclusão com a ciclodextrina, classicamente a constante de afinidade do complexo é dependente da temperatura sendo que seu valor tende a diminuir com o aumento da temperatura devido à dissociação do complexo (Bekers et al., 1991). Dentre os métodos utilizados para determinação do valor de K estão as isotermas de solubilidade, onde a molécula "hóspede", ao encontrar-se em um sistema composto por CD e água, pode mudar sua solubilidade. Esta mudança pode ser representada por um aumento até certo limite ou até mesmo uma diminuição da solubilidade inicial (Másson et al., 1999).

A 20 °C observa-se um aumento linear na solubilidade da NF em função do aumento da concentração de ciclodextrina, sugerindo que os complexos formados são de primeira ordem (Tipo A - considerando-se uma estequiometria de complexação 1:1) (Másson et al., 1999). Nestes experimentos de isotermas de solubilidade, a NF foi

adicionado em uma concentração acima da solubilidade, desta forma o aumento da concentração determinado a 20 °C é devido à formação do complexo de inclusão solúvel (Másson et al., 1999).

No entanto, acima de 20 °C, os diagramas de solubilidade da NF apresentam uma modificação no perfil. Deixam de ser do Tipo A₁, ou seja, onde a solubilidade aparente da NF aumenta linearmente em função do aumento da concentração de ciclodextrina passando para o Tipo B (Figura 3), onde o complexo formado passa a ser insolúvel.

No caso da isoterma da NF a 25 °C o diagrama se mostra do Tipo B_s, onde observa-se que com o aumento da concentração de ciclodextrina, que ocorre a formação de complexo solúvel o qual aumenta a solubilidade do fármaco, no entanto, a partir de 30 mM, a solubilidade máxima do fármaco (que está livre e em complexo) é atingida o que faz com que quantidades adicionais de ciclodextrina forme um complexo insolúvel, causando uma diminuição na concentração de fármaco solubilizado.

Já para as temperaturas de 30 e 35 °C a isoterma de solubilidade da NF apresenta-se do Tipo B_i, onde estes são similares ao do Tipo B_s, exceto pelo fato do complexo formado já iniciar-se como insolúvel, não apresentando um aumento seguido a um decréscimo na solubilidade do fármaco.

O valor da constante de afinidade entre NF e ciclodextrina foi determinada a partir da parte linear da Figura 3 e utilizando-se a Equação 2. Os valores de constante obtidos para as temperaturas de 20 °C e 25 °C foram $14,9 \pm 2,3$ e $10,8 \pm 1,2 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

Para a NF observa-se que com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição na constante de afinidade. No entanto, os valores de constante de afinidade são baixos indicando assim que a complexação entre a molécula de NF e a cavidade interna da HP-β-CD não é grande quando comparada a outros fármacos (Tong et al., 1991; Pinto et al., 2005). O motivo desta baixa afinidade pode ser devido a diversos fatores, dentre eles o tamanho/geometria da cavidade da ciclodextrina, solubilidade relativa e energia conformacional do fármaco.

Uma vez que a complexação é diminuída em função da temperatura isto indica que esta é dependente da entalpia, como relatado para muitos complexos de inclusão (Stalcup et al., 1990; Tong et al., 1991; Morin et al., 1998; Flood et al., 2000; Del Valle, 2004).

A formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas é atribuído a valores negativos de ΔH° (exotérmicos), indicando assim a existência de forte interação hidrofóbica, enquanto que os valores de ΔS° podem ser negativos ou ligeiramente positivos, indicando que a inclusão da molécula hóspede não acompanha uma dessolvatação muito forte, levando a formação de complexos que são governados primariamente por processos entálpicos (Stalcup et al., 1990; Tong et al., 1991; Morin et al., 1998; Flood et al., 2000; Del Valle, 2004). Neste caso, provavelmente as interações entre fármaco e ciclodextrina não são tão eficazes, ou seja, a interação não é tão fortemente hidrofóbica e o

processo de dessolvatação é dificultado.

No entanto, mesmo o valor da constante de afinidade para a complexação do NF com HP- β -CD ser baixo comparado a outros fármacos, foi observado variações na fotodecomposição e no perfil de liberação da NF em presença de ciclodextrina.

A presença de ciclodextrina no meio causou uma proteção na fotodecomposição do fármaco, isto devido a quando em presença de ciclodextrina, existe um equilíbrio entre moléculas livres e inseridas na cavidade da ciclodextrina, o que faz com que um menor número de moléculas estejam livres para serem fotodecompostas, alterando assim a cinética de decomposição da NF.

A NF foi exposta a duas condições de incidência de radiação, sendo que o mesmo comportamento foi encontrado quando as amostras foram expostas a luz solar ou a uma luz UV (Figura 4 a e b), no entanto a decomposição da NF por luz solar ocorreu com uma velocidade maior que para a luz UV, isto devido a intensidade e a faixa de comprimentos de onda no ultravioleta proveniente da luz do Sol serem maiores que pela lâmpada (254nm). Relatos semelhantes foram descritos na literatura para outros fármacos (Mielcarek, 1994; Chen et al., 1996; Mielcarek & Daczowska, 1999; Bayomi et al., 2002; Yap et al., 2004).

Além disso a interação da NF com a HP- β -CD apresentou uma modificação no seu perfil de liberação em presença de ciclodextrina, onde a molécula de NF (sozinha) apresenta uma liberação monoexponencial, indicando assim que existe apenas uma constante de equilíbrio entre o compartimento interno e o externo (Figura 5). No entanto, para o complexo, o melhor ajuste para da curva de liberação apresentou um comportamento biexponencial, indicando assim, a existência de dois equilíbrios dentro do compartimento doador do sistema de diálise. Neste caso, inicialmente o fármaco que se encontra livre da cavidade da ciclodextrina apresenta uma liberação rápida (k_1) enquanto que aquele que está associado a cavidade da ciclodextrina apresenta uma liberação mais lenta (k_2). Resultados semelhantes foram descritos para anestésicos locais (Moraes et al., 2007)

O fato de uma liberação menor da NF (quando em presença de ciclodextrina) é devida a existência do equilíbrio de complexação do fármaco com a cavidade interna das ciclodextrinas dentro do compartimento doador, uma vez que devido ao poro da membrana de diálise ser de 1000 Da de massa e a HP- β -CD possuir massa média de 1480 Da, esta não atravessa a membrana, ficando ao longo do tempo constante no compartimento doador (Moraes et al., 2007). Porém com a liberação da molécula do fármaco em função do tempo através da membrana, a proporção de ciclodextrina:fármaco no compartimento doador vai aumentando. Este aumento na proporção ciclodextrina:fármaco, causando um deslocamento no equilíbrio em função da formação de complexo, o que faz com que a liberação do NF seja mais lenta em função do tempo, ou seja, modificada devido a complexação. Este mesmo comportamento foi descrito na literatura para complexos entre anestésicos locais e ciclodextrinas (Moraes et al., 2007).

Desta forma, a fim de se obter maiores informações sobre a inserção da NF na cavidade da HP- β -CD, foi determinada a estequiometria de complexação. A complexação com a cavidade das ciclodextrinas, depende principalmente da polaridade e do tamanho da molécula que se tem interesse em formar complexo de inclusão, desta forma, quando da inserção da molécula, modificações nas propriedades desta são observadas, como exemplo variações na intensidade máxima de absorbância.

A Figura 6 apresenta o resultado obtido pelo método de variação contínua (*Job plot*) para a variação de absorbância da NF. A posição de máximo no *Job plot* em 0,5 para a NF, o que indica que a complexação possui estequiometria de 1:1, ou seja, 1 molécula de NF para cada de HP- β -CD.

O complexo foi caracterizado ainda por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 7 mostra que os cristais de HP- β -CD apresentam uma estrutura arredondada e bem definida, já para o NF foi observado estruturas pequenas, cúbico - retangulares. A mistura física entre NF e HP- β -CD mostra as características dos cristais do fármaco e HP- β -CD isolados, indicando a ausência de complexação. Em relação ao complexo sólido, observou-se alteração evidente na morfologia original dos cristais da HP- β -CD e do NF, indicando assim, que a estrutura cristalina dos dois compostos foi perdida, evidenciando a formação de complexo, como descrito na literatura para outros compostos (Pinto et al., 2005, Moraes et al., 2007).

Sendo assim, a inserção da molécula de NF na cavidade interna da HP- β -CD faz com seja observada alterações na solubilidade, diminuição na fotodecomposição, mudanças no perfil de liberação, bem como na morfologia da estrutura cristalina do fármaco. Estas modificações são importantes do ponto de vista farmacológico uma vez que potencializam a utilização deste fármaco na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina, abrindo perspectivas para a avaliação da atividade biológica do complexo em comparação ao fármaco livre, sendo assim, uma possível nova alternativa para a utilização do NF no tratamento de doenças.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro (Proc. N° 05/03045-9) e bolsas de iniciação científica (C.M.M. - Proc. N° 04/02091-4, R.G. - Proc. N° 06/00787-7).

ABSTRACT

Preparation and initial characterization of inclusion complex between nitrofurazone and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Nitrofurazone (NF), 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone, a broad-spectrum antibiotic, has reported toxic effects

and low solubility in water. It would be of great interest to form inclusion complexes between NF and a cyclodextrin, to develop more effective and safer antibiotic formulations. This paper focuses on the preparation of inclusion complexes of NF with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) and their initial characterization by evaluating rates of complex formation, photostability, solubility isotherms, release rate profiles, stoichiometry of the complexes and their morphology, as revealed by scanning electron microscopy. The kinetic tests of complex formation revealed that 17,3 h is enough for stabilization of the NF-cyclodextrin complex. The solubility isotherm studies showed that the isotherm changes from type A to type B, as a function of temperature. The photostability experiments showed that the insertion of the NF in the HP- β -CD cavity protects the drug from photodecomposition. The release kinetic tests showed that the profile of NF release from the complex is altered by the presence of HP- β -CD in the medium. A Job's plot indicated that the stoichiometry of the complex was 1:1 NF:HP- β -CD. The scanning electron micrographs showed changes in the crystal structure of NF in the complex. This study focused on the physicochemical properties of drug-delivery formulations that could potentially be developed into a novel type of therapy with NF.

Keywords: nitrofurazone; cyclodextrin; inclusion complex.

REFERÊNCIAS

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12:413-20.

Araújo DR, Pinto LMA, Braga AFA, de Paula E. Drug-delivery systems for local anesthetics: therapeutic applications. *Rev Bras Anestesiol* 2003; 53:663-71.

Azevedo MBM, Alderete JB, Rodriguez JA, Souza AO, Rettori D, Torsoni MA, Faljoni-Alario A, Haun M, Duran N. Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -Cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2000; 37:93-101.

Bayomi MB, Abanumay KA, Al-Angary AA. Effect of inclusion complexation with cyclodextrins on photostability of nifedipine in solid state. *Int J Pharm* 2002; 243:107-17.

Bekers O, Uijtendaal EV, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJM. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev Ind Pharm* 1991; 17:1503-49.

Chen CC, Chen FA, Wu A, Hsu H, Kang J, Cheng H. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility, photostability and in-vitro permeability of alkannin/shikonin enantiomers. *Int J Pharm* 1996; 141:171-8.

Connors KA. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem Rev* 1997; 97:1325-58.

Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* 2004; 39:1033-46.

Dodd MC, Stillman WB. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 1944; 82:11-8.

Etos S, Noda H, Noda A. J. Simultaneous determination of antiepileptic drugs and their metabolites, including chiral compounds, via beta-cyclodextrin inclusion complexes by a column-switching chromatographic technique. *J Chromatogr B* 1994; 19:385-90.

Flood KG, Reynolds ER, Snow NH. Characterization of inclusion complexes of betamethasone-related steroids with cyclodextrins using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000; 903:49-65.

Gonçalves MF, Chung MC, Colli W, Miranda MTM, Ferreira EI. Efeito da associação da nitrofurazona e primaquina em células LLC-MK2 infectadas com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 27:164.

Henderson GB, Ulrich P, Fairlamb AH, Rosemberg I, Pereira M, Sela M, Cerami A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulphide reductase, alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:5374-8.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of ciclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 1997; 86:147-62.

Ivanov PM, Salvatierra D, Jaime C. Experimental (NMR) and Computational (MD) Studies on the Inclusion Complexes of 1-Bromoadamantane with alpha-, beta-, and gamma-Cyclodextrin. *J Org Chem* 1996, 61:7012-7.

Laverde Jr A, Conceição GJA, Queiroz SCN, Fujiwara FY, Marsaioli AJ. An NMR tool for cyclodextrin selection in enantiomeric resolution by high-performance liquid. *Magn Reson Chem* 2002; 40:433-42.

Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm* 2001; 225:15-30.

Loukas YL, Vraka V, Gregoriadis G. Drugs in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *Int J Pharm* 1998; 162(2):137-42.

Másson M, Loftsson T, Másson G, Stefánsson E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *J Control Release* 1999; 59(1):107-18.

Matioli G. *Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*. Maringá: Eduem Editora; 2000. 124p.

- McCormack B, Gregoriadis G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs *in vivo*. *Int J Pharm* 1998;162:59-69.
- Mielcarek J, Daczowska E. Photodegradation of inclusion complexes of isradipine with methyl-beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 21(2):393-8.
- Mielcarek J. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility, photostability and in-vitro permeability of alkannin/shikonin enantiomers. *Int J Pharm* 1994; 141:171-8.
- Moraes CM, Abrami P, Gonçalves MM, Andreo-Filho N, Fernandes SA, de Paula E, Fraceto LF. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Quím Nova* 2007, 30:777-84.
- Morin N, Guillaume YC, Peyrin E, Rouland JC. Peculiarities of an imidazole derivative retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: β -cyclodextrin concentration and temperature considerations. *J Chromatogr A* 1998; 808:51-60.
- Nichols W. Antiinfeciosos In: Gennaro, AR. (Ed.) *Remington: a ciência e a prática da farmácia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Paavola A, Yliruusi J, Kajimoto Y, Kalso E, Wahlström T, Rosenberg P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. *Pharm Res* 1995; 12:1997-2002.
- Pinto LMA, Fraceto LF, Santana MH, Pertinhez TA, Oyama-Junior S, de Paula E. Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. *J Pharm Biomed Anal* 2005, 39:956-63.
- Pomponio R, Gotti R, Fiori J, Cavrini V, Mura P, Cirri M, Maestrelli F. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 2003; 244:127-35.
- Race PR, Lovering AL, Green RM, Osson A, White SA, Searle PF, Wrighton CJ, Hyde ELJ. Structural and mechanistic studies of Escherichia coli nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *J Biol Chem* 2005; 280:13256 -64.
- Stalcup AM, Chang SS, Armstrong DW, Pitha, JJ. (S)-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, a new chiral stationary phase for reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1990; 513:181-94.
- Thomas G. Solubilidade dos fármacos. In: *Química medicinal: uma introdução*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. 345p.
- Tong WQ, Lach JL, Chin TF, Guillory JK. Microcalorimetric investigation of the complexation between 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and amine drugs with the diphenylmethyl functionality. *J Pharm Biomed Anal* 1991; 9:1139-46.
- Yap KL, Liu X, Thenmozhiyal JC, Ho PC. Photostability studies on nicardipine-cyclodextrin complexes by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35:267-75.