

DESENVOLVIMENTO E ESTUDOS DE FORMULAÇÕES DE VEÍCULOS E DROGAS HIDROFÓBICAS ACEITAS PELA FARMACOPÉIA AMERICANA CICLOPALADADOS PARA VIABILIZAR O USO DE PALADACICLO BIFOSFÍNICO COMO DROGAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Fernanda Maria Pinheiro Machado Nogueira¹; Alison L. Matsuo²;
Antonio Carlos Fávero Caires³

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: fezinha_machado@hotmail.com¹

Estudante do Departamento de biologia Celular imunologia e parasitologia UNIFESP; e-mail: almatso@unifesp.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: caires@umc.br³

Área do Conhecimento: Farmacologia

Palavras-chaves: Ciclopaladados; Chagas; Paladaciclo bifosfínico; Veículos

INTRODUÇÃO

O *Trypanossoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, transmitido principalmente pela picada do inseto *Triatoma infestans* popularmente conhecido como Barbeiro. Atualmente cerca de oito milhões de pessoas estão infectadas em países da América Latina onde a maior preocupação é o desenvolvimento de cardiomiopatias. O tratamento é realizado quase exclusivamente com Benznidazol (Rochagan), o qual se mostrou eficaz apenas na fase aguda da doença. Apesar da quantidade de pessoas infectadas, há poucos estudos sobre o desenvolvimento de drogas para este parasita, principalmente para a fase crônica da doença. Nosso Grupo de Pesquisas em Organometálicos, do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica da Universidade de Mogi das Cruzes tem conseguido inúmeros avanços na elucidação mecânica e no “design” de novas drogas organometálicas envolvendo compostos paladaciclos com propriedades antitumorais e antiparasitárias (CAIRES *et. al.*, 2008).

OBJETIVOS

Uma das grandes dificuldades de aplicação do paladaciclo descrito, no combate à doença de Chagas é o seu caráter hidrofóbico. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de formulações eficazes da droga por via oral e transdérmica.

METODOLOGIA

Iniciamos os experimentos utilizando como primeira formulação Dimetilsulfóxido (DMSO – 1%), Éster graxo (Mygliol 810 – 49%), Ácido graxo (Ácido Oléico) (ADACHI *et. al.*, 1993) e a droga 7A (Paladaciclo) na concentração de 1mg/ml da emulsão resultante. Para a preparação da emulsão pesou-se 10 mg do composto 7A que foram dispersos em uma mistura de solventes 10 ml de ácido oléico, 10 ml de Mygliol 810 e 200 microlitros de DMSO. A mistura foi agitada em Vórtex e banho de ultra-som de formas alternadas até a obtenção de uma suspensão homogênea, no tempo de aproximadamente 30 minutos. Ensaios biológicos por via cutânea e oral foram então realizados. Utilizaram-se 5 camundongos Balb/C fêmeas para cada grupo de estudo. Em um primeiro grupo, colocamos

48 microlitros da suspensão, em contato com o dorso do camundongo. No segundo grupo, aplicamos a mesma dose do veículo 1 por via oral (gavagem) para uma comparação de toxicidade. Em ambos os casos grupos controle foram utilizados. Aguardaram-se trinta minutos para a realização da infecção. Após esse período, introduzimos 500 parasitas na forma tripomastigota e acompanhamos a mortalidade durante 28 dias. Em um segundo experimento foram utilizados 4 camundongos Balb/C para cada grupo de estudo e a seguinte formulação: Pomada 1 (250mg de lecitina de soja, 10mg da droga 7A e 200mg de ácido oléico; Pomada 2 (250mg de lecitina, 10mg da droga 7A, 20mg de Fosfoetanolamina e 200mg de ácido oléico), e realizada a raspagem do pêlo na região dorsal. Infectaram-se 500 parasitas na forma tripomastigota e após trinta minutos, aplicamos a pomada I na região dorsal, protegendo o local com um band-aid e fita adesiva. O mesmo fizemos com a pomada II e com o grupo controle e acompanhamos a morte durante 18 dias. Já no terceiro experimento, formulamos um novo veículo para ser testado juntamente com a droga 7A por via oral. Para isso, utilizamos soro de leite doce liofilizado livre de gordura. Para dissolução do pó foi adicionado 10g do pó concentrado em 100 ml de água destilada e solubilizado a temperatura ambiente em um homogeneizador a 200rpm por 1h. A quitosana empregada para heterocoagulação foi de média massa molar com 75-85% de grau de desacetilação e viscosidade de 200-800 cPs (Sigma-Aldrich 44.887-7). A quitosana foi solubilizada em homogeneizador de hélice a velocidade de 2000 rpm. O polissacarídeo juntamente com ácido cítrico P.A (0,4mg.ml⁻¹) foram adicionados em água destilada a temperatura ambiente sob agitação por 24horas. Após esta etapa, a solução de quitosana foi adicionada ao soro de leite previamente diluído (25 +/- 1°C) numa proporção de 1:1 com o objetivo de obter os complexos protéicos. A precipitação das frações protéicas do soro de leite, foram feitas através de ajuste de ph com NAOH até o valor de 4,5. Após esse processo a solução foi mantida em agitação por 10 minutos e em seguida mantida em repouso por 20 minutos até a formação de precipitado. A solução foi centrifugada a 4 °C por 10 minutos e 300rpm, onde o sobrenadante foi descartado. O sólido restante foi redissolvido em 60ml de água, obtendo-se assim o veículo pretendido. Após obtermos o veículo iniciamos novos experimentos, com o objetivo de verificar os benefícios da via transdérmica e com isso, viabilizar o paladaciclo bifosfínico para o tratamento da doença de Chagas. Primeiramente, infectamos 5 camundongos para cada grupo com 500 parasitas na forma tripomastigota. Após o primeiro dia da infecção, aplicamos o veículo por via oral (gavagem) em um primeiro grupo, o veículo e a droga 7A em um segundo grupo, droga 7A no terceiro grupo, e no quarto (controle), apenas o veículo. Observamos a mortalidade durante 28 dias. Foi utilizado 100UL da droga 7A na concentração de 50UM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados biológicos obtidos, verificamos no experimento1 que o veículo por via oral gerou uma maior sobrevida nos camundongos, mostrando ser uma via promissora para a droga 7A (17dia = 60% de sobrevida; 18dia = 20% de sobrevida; 19dia – 0% de sobrevida) comparada ao controle (17dia = 80% de sobrevida; 18dia = 0% de sobrevida) e a via cutânea (17dia = 80% de sobrevida; 18dia = 0% de sobrevida). Já no segundo experimento, a Pomada I foi a que apresentou melhor eficácia (17dia = 25% de sobrevida; 18dia = 0% de sobrevida), quando comparada a Pomada II (15dia= 75% de sobrevida; 16dia = 0% de sobrevida) e ao grupo controle (15dia = 75% de sobrevida; 16dia = 0% de sobrevida), porém gerou efeito adverso, como lesões cutâneas de

aproximadamente 0,5x 0,5 cm; hiperemiadas, demonstrando mais uma vez que não é a melhor via.

Finalmente, no terceiro experimentos encontramos resultados surpreendentes e satisfatórios demonstrando que a melhor sobrevida ocorreu no grupo em que foi aplicada a droga 7A juntamente com o veículo (16dia = 60% de sobrevida; 22dia = 40% de sobrevida; 26dia = 20% de sobrevida; 28dia = 0% de sobrevida). Veículo (14dia = 60% de sobrevida; 15dia = 0% de sobrevida); Droga 7^a (14dia = 80% de sobrevida; 15dia = 0% de sobrevida); Controle (14dia = 60% de sobrevida; 15dia = 0% de sobrevida).

CONCLUSÕES

Através desses ensaios biológicos, concluímos que a formulação transdérmica de nosso composto 7A, não é viável ao nosso projeto devido a sua baixa efetividade (Pomada I - 17dia = 25% de sobrevida; 18dia = 0% de sobrevida; Pomada II- 15dia= 75% de sobrevida; 16dia = 0% de sobrevida) e por causar lesões cutâneas extensas importantes. Do ponto de vista das formulações orais, esta se mostra mais eficaz (17 dia = 60% de sobrevida; 18 dia = 20% de sobrevida; 19 dia – 0% de sobrevida) e nos convida a realização de outros experimentos, para testar não somente sua eficiência, como também seus possíveis efeitos adversos (nefrotoxicidade). Esses serão nossos próximos desafios, pois o maior já está comprovado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, H. I. T; UEKAMA, K; MARAKO, T; TANO, T; SAITA, M. Combination effects of Ocarboximetil- O-etil-b-cyclodextrin and penetration enhancer. Eur. J. Pharm. Sci., New York, v.1,p.177,1993.

CAIRES, A. C. F; TERSARIOL, I. L. S; BINCOLETTO, C. Cyclopalladated compound, composition and dosage unit, their uses, method to inhibit the activity of proteins and enzymes, method of treatment for disorders or diseases associated to them and method of modulation for the immunological system. US Patent –US 7,432,403 B2, 1-35, 2008.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fapesp, Faep/UMC pela ajuda financeira para realização do projeto; ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Fávero Caires por toda dedicação e apoio e, finalmente, ao colaborador Alison L. Matsuo da UNIFESP por ter ajudado na realização dos experimentos.