



Ligninas como excipiente de benzidazol e praziquantel: um estudo experimental

Josué Filipe de Oliveira Moraes Miranda¹, Lisandra da Silva Lima², Karla Crystina Costa dos Santos³, Carolina Ávila dos Anjos Santos⁴, Arthur Van Lauter Albuquerque Pereira⁵, Diego Santa Clara Marques⁶

¹Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil (josue.oliveira.br@gmail.com)

^{2,3,4,5,6}Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Resumo: As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) afetam regiões pobres e carecem de investimentos em pesquisa. As ligninas, com propriedades biológicas promissoras, foram avaliadas como excipientes para fármacos. Ligninas extraídas de três espécies mostraram rendimento de 82% e atividade contra parasitos, com efeito dose-dependente. Apresentaram liberação controlada dos medicamentos, indicando potencial no tratamento de DTNs e um potencial material bioativo.

Palavras-chave: Lignina; doenças tropicais negligenciadas; excipiente; praziquantel; benzidazol

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são doenças tropicais endêmicas de regiões pobres na Ásia, América Latina e África, com significativo impacto na saúde e rotina de populações econômica e socialmente sensíveis, mas que não recebem atenção devida da saúde pública e da pesquisa. Anualmente, 200 mil mortes são registradas no mundo por DTNs, dessas mortes 10 mil são registradas somente na América Latina, sendo causada majoritariamente pela doença de chagas (Brito et al., 2022). Além disso, a pesquisa em relação ao desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos para as DTNs é severamente subfinanciada tanto pelas políticas públicas quanto pela indústria farmacêutica (Weng et al., 2018). Entre 2000 e 2011 por exemplo, apenas 4% do total de vacinas e medicamentos desenvolvidos correspondiam as doenças negligenciadas (Vasconcelos et al., 2015), um número pequeno para as 1,2 bilhão de pessoas que estão em situação de vulnerabilidade a essas doenças (Lindoso et al., 2009).

Portanto, a investigação de moléculas ou de outras formas de tecnologia para o combate as DTNs é essencial, nesse sentido a tecnologia farmacêutica pode ser uma ferramenta essencial para otimizar o efeito de moléculas com capacidade de tratamento já conhecida na literatura científica. As ligninas, macromoléculas abundantes em compostos fenólicos em sua estrutura, são conhecidas na literatura por uma variedade de atividades biológicas, como leishmanicida, antifúngica, bactericida, antibacteriana, antioxidante e entre outras (Da Silva Lima et al.,

2024), podem servir como potenciais excipientes de fármacos, aumentando a solubilização de moléculas, facilitando a passagem por barreiras biológicas e controlando a liberação do medicamento, potencialidade essa que foi evidenciada por Pishnamazi et al, (2019). Por isso, o estudo buscou avaliar a potencialidade das ligninas extraídas de *Clarisia racemosa*, *Protium punctulatum* e *Scleronema micranthum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, as ligninas foram obtidas e isoladas de *Clarisia racemosa*, *Protium punctulatum* e *Scleronema micrathum* seguindo a metodologia descrita por Cruz-filho et al. (2019) o tronco foi macerado e sujeito a extração com sistema (50v/50v) ciclohexano/etanol em frascos de vidro hermeticamente fechados por uma semana. Após isso, o material foi filtrado e a fração sólida foi seca em forno a peso constante a 105 ± 2 °C em estufa por 72 h. o material sólido foi então acidificado com 2% de H₂SO₄ para depois sofrer um processo de deslignificação alcalina com 1% de NaOH, por filtragem foi separado massa sólida do liquor negro, tratado posteriormente com H₂SO₄ para precipitação da lignina.

As ligninas foram testadas para atividade antiparasitária com *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*. Para *T. cruzi*, fibroblastos foram fixados em microplaca de 96 poços para cultura de tecidos, a uma concentração de 4×10^3 por



poço em um volume de 80µL e incubado durante a noite, após esse período o parasito foi inoculado a uma concentração de 4×10^4 por poço em um volume de 20µL. Após 2 horas, o meio contendo tripomastigotas que não penetraram nas células foram descartados e substituído por 200 µL de meio fresco. Após 48 horas o meio foi novamente descartado e substituído por 180 µL de meio fresco contendo lignina em concentrações variando de 6,25 e 100µg/mL e benznidazol como controle positivo. Após 7 dias de incubação, foram adicionadas as placas os reagentes Vermelho de clorofenol-β-D-galactopiranosídeo. As placas foram lidas em leitor de microplaca com absorbância na faixa de 570nm. Já para *Schistosoma mansoni*, em placas de 24 poços com 2 ml de meio, os vermes foram inoculados e incubados a 37 °C em ambiente umidificado com 5% de CO₂, então foi adicionada lignina diluída em 1% DMSO em concentrações variando de 125 a 500µg/mL, praziquantel foi utilizado como controle positivo. Os vermes foram analisados utilizando microscópio invertido nos períodos de 3h, 6h, 12h e 24h após tratamento e subsequentemente nos intervalos de 48h, 72h e 96h, observando a motilidade. Como critério para análise, os parasitos foram agrupados segundo classes de motilidade variando de 0 a 3. Os parasitos agrupados na classe 0 estavam mortos ou completamente ausentes de movimentos, na classe 1 severo dano a integridade e pouco movimento observado, na classe 2 redução dos movimentos mas ainda apresentam sucção ativa, e na classe 3 sem redução significativa na motilidade.

Para a formulação dos comprimidos, testes de solubilização, friabilidade, resistência mecânica e desintegração, foram utilizadas as metodologias descritas por Pishnamazi et al. (2019), Silva et al. (2023) e Eason et al. (2022). Os comprimidos formulados com lignina possuíam 3% de seu peso composto por croscarmelose sódica, 1% de magnésio, 20% de lactose, 20% de lignina, 51% de celulose cristalina e 5% de praziquantel ou benznidazol a depender do comprimido. Para os comprimidos sem lignina, sua massa era composta por 71% de celulose cristalina e o restante seguiu a proporção do comprimido com lignina. A dissolução foi realizada em tanques de dissolução em temperatura de 37°C, em 900ml de HCL 0,1 mol/L sob agitação de 50rpm por 30 minutos. Após esse período, uma alíquota de 15ml foi retirada do sistema, filtrada e diluída em frascos de 50ml para análise de estabilidade de sistema em cromatografia líquida de alta performance, o teste foi repetido analisando períodos de 5min a 120 min. Os testes de friabilidade, resistência mecânica e desintegração foram realizadas utilizando aparelho de desintegração com água em uma temperatura de 37°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento das ligninas avaliadas foram de 82%, o que está dentro do intervalo reportado por autores como Silva et al. (2023), as diferenças de rendimento podem ser explicadas pela sazonalidade e condições de extração e armazenamento da madeira utilizada. Os resultados da atividade esquistomicida pelas ligninas são apresentadas na imagem 1.

Grupos	24H				48H				72h				96h			
	Classe de motilidade															
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Praziquantel 10 µm	100%	-	-	-	100%	-	-	-	100%	-	-	-	100%	-	-	-
Lignina 500 µg/mL	-	51,25%	49,75%	-	-	75%	25%	-	6,9%	82,5%	10,6%	-	12,5%	81,25%	6,25%	-
Lignina 250 µg/mL	-	21,25%	78,25%	-	-	22,5%	77,5%	-	-	88,1%	11,9%	-	-	78,75%	21,25%	-
Lignina 125 µg/mL	-	6,25%	93,75%	-	-	11,9%	89,4%	-	-	10,63%	89,4%	-	-	6,9%	93,1%	-

Imagem 1: porcentagens referentes ao total de parasitos. parasitos distribuídos em classes de motilidade, 0 = paralisia total ou morte do parasito; 1= danos severos ao parasito, pouca mobilidade e ausência de sucção; 2 = redução na mobilidade, ainda apresenta sucção; 3= sem redução na mobilidade nem danos significativos

Os resultados avaliados demonstram que a exposição dos parasitos a lignina e a ação dela em relação a motilidade é dose-dependente e varia conforme o tempo de exposição. Para a concentração de 500 µg/mL, já nas primeiras 24h apresentou-se paralisia de mais da metade dos vermes, e as 96h evoluiu para morte de 12,5% dos parasitos. Para as concentrações abaixo de 500µg/mL foi observado uma redução da motilidade gradual, porém não evoluiu para a morte do parasito.

Já a avaliação da atividade tripanocida apresentou um IC50 de 19,41µg/mL, e um índice de seletividade (SI) de 1,9, resultados promissores, porém inferiores ao controle benznidazol que apresentou IC50 de 1,1 µg/mL e SI de 29. A diferença de seletividade se dá por conta de 2 mecanismos, a redução do grupo nitro (NO₂) em amina (NH₂) formando um metabolito mais ativo e pelo estímulo na produção de citocinas interferon gama que aumentam a ação fagocitária do sistema imunológico.

Os comprimidos apresentaram resultados conforme a tabela 1.



Parâmetros	Tipo de comprimido			
	TLCR	TLPP	TLSM	TC
Dureza (Kgf/cm ²)	5.3± 0.4	5.2± 0.3	5.0± 0.4	4.5± 0.9
Uniformidade (%)	99.5± 0.34	99.8± 0.44	99.2±0.30	99.6± 0.49
Friabilidade (%)	0.93± 0.02	0.95± 0.0	0.92±0.05	0.18± 0.0
Tempo de desintegração (min)	40.1± 0.41	53.5± 0.6	60.0±0.0	36.0± 0.1
Tempo até uniformidade de liberação do fármaco (min)	40.1± 0.41	53.5± 0.6	60.0±0.0	36.0± 0.1

tabela 1: ± desvio padrão; TLCR tablete lignificado de *Clarisia racemosa*; TLPP tablete lignificado de *Protium punctulatum*; TLSM *Scleronema micranthum*; TC tablete controle (sem lignina)

Em relação aos tempos de desintegração e de liberação do fármaco, percebe-se que sofreram a mesma tendência, resultado similar foi identificado por Gil-Chavez et al. (2021) e Pishmazani et al. (2019), esse aumento no tempo de dissolução em relação aos tabletes controles significam um maior controle da liberação dos fármacos, seja do praziquantel ou do benznidazol.

CONCLUSÃO

Em resumo, as ligninas apresentaram uma atividade tripanocida promissora e esquistomicida moderada para a maior concentração testada, é importante destacar que dentro da literatura as ligninas são conhecidas por serem macromoléculas de baixa citotoxicidade, sustentado por estudos como o de Araujo et al. (2022) e por apresentar atividade imunomodulatória promissora (Da Silva Lima et al., 2024). Além disso, elas podem ser de interesse para a indústria farmacêutica ao controlar o tempo de liberação de um fármaco dentro do organismo, sendo um material bioativo e com uma boa versatilidade de efeitos biológicos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia em Pernambuco (FACEPE) e ao laboratório de química e inovação terapêutica (LQIT)

REFERÊNCIAS

Brito, S. P. de S., Ferreira, A. F., Lima, M. da S., & Ramos Jr., A. N. (2022). Mortalidade por doenças

tropicais negligenciadas no Piauí, Nordeste do Brasil: tendência temporal e padrões espaciais, 2001-2018. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 31(1), 1-14 doi.org/10.1590/S1679-49742022000100014

Weng HB, Chen HX, Wang MW. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. *Infect Dis Poverty*. 2018; 7(1):1-9. doi: 10.1186/s40249-018-0444-1

Vasconcelos, R. S., Kovalski, D. F., & Junior, Z. C. T. (2015). Doenças Negligenciadas: revisão da literatura sobre as intervenções propostas. *Saúde & Transformação Social/Health & Social Change*, 6(2), 114-131.

Lindoso, J.A.L. & Lindoso, A.A.B.P. - Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 51(5): 247-253, 2009

da Silva Lima, L., de Oliveira, I. M., Cavalcante, L. A. O., Miranda, J. F. D. O. M., Da Silva, A. F. F., Silva, M. G. C., ... & da Cruz Filho, I. J. (2024). Biological potential of alkaline lignins: A brief review. *Scientific Electronic Archives*, 17(4). doi.org/10.36560/17420241941

I.J. Cruz Filho, B.R. da Silva Barros, L.M. de Souza Aguiar, C.D.C. Navarro, J. S. Ruas, V.M.B. de Lorena, A.M.S. Maior, Lignins isolated from prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production, *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019) 1331–1339, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.120>.

Silva, et al., In vitro evaluation of antioxidant, cytotoxic, trypanocidal and antimicrobial activities of lignin obtained from *Caesalpinia ferrea* leaves and its use as an excipient in the release of oxacillin and fluconazole, *Int. J. Biol. Macromol.* 126225 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126225>.

Eason, et al., Revisiting the dissolution of praziquantel in biorelevant media and the impact of digestion of milk on drug dissolution, *Pharmaceutics* 14 (2022) 2228, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102228>.

J. Gil-Chavez, ´ S.S.P. Padhi, C.S. Leopold, I. Smirnova, Application of aqueous lignin in ibuprofen-loaded pharmaceutical formulations obtained via direct compression and wet granulation, *Int. J. Biol. Macromol.* 174 (2021) 229–239, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.064>.

D.M.F. Araújo, I.J. da Cruz Filho, T. Santos, D.T.M. Pereira, D.S.C. Marques, A.D.C. A. de Lima, F. Nogueira, Biological activities and physicochemical characterization of alkaline lignins obtained from branches and leaves of *Buchenavia viridiflora* with potential pharmaceutical and biomedical



applications, Int. J. Biol. Macromol. 219 (2022) 224–
245, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.225>.