

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Cezar Augusto da Cruz Amorim

**Caracterização físico-química de novos complexos de inclusão do fármaco β -
lapachona utilizando polímeros.**

Recife – 2016

CEZAR AUGUSTO DA CRUZ AMORIM

Caracterização físico-química de novos complexos de inclusão do fármaco β -lapachona utilizando polímeros.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadores:

Prof. Dr. Severino Alves Junior

Profa. Dra. Iane Bezerra Vasconcelos Alves

Recife – 2016

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A524c Amorim, Cezar Augusto da Cruz.
Caracterização físico-química de novos complexos de inclusão do fármaco β -lapachona utilizando polímeros / Cezar Augusto da Cruz Amorim. – 2016.
81 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências.

1. Tabebuia avellanadae. 2. Ipê-rôxo. 3. Solubilidade. 4. β -lapachona.
5. Complexo de inclusão. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora).
II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-140)

Nome: AMORIM, C.A.C.

Título: Caracterização físico-química de novos complexos de inclusão do fármaco β -lapachona utilizando polímeros.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessária ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de Planejamento e Síntese de Fármacos.

Aprovada em: 09/03/2016

Banca Examinadora

Prof.. Dr. Jorge Luiz Neves

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Recife – 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas dourado

VICE-REITORA

Prof^a. Dr^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dalci José Brondanni

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Antônio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

RESUMO

A β -lapachona é uma naftoquinona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) de peso molecular $243,3 \text{ g.mol}^{-1}$ presente na *Tabebuia avellanedae* Lor, árvore conhecida como ipê roxo ou pau d'arco roxo. Esta naftoquinona é uma substância que pode ser obtida por uma semi-síntese a partir do lapachol bem como do lomatiol. Este bioativo apresenta múltiplos efeitos farmacológicos, como antibacteriano, antifúngico, antiviral, anti-inflamatório e anti-proliferativo. Segundo o sistema de classificação biofarmacêutica, a β -lapachona (BL ou β -lap) é classificada como classe II apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade. Desta forma, faz necessário um estudo de incremento de solubilidade aquosa. O objetivo deste trabalho foi caracterizar físico-quimicamente os complexos propostos utilizando dois polímeros: o dendrímero *bis*-MPA (DEN) e a cucurbit[6]urila (CUC). O presente estudo mostra duas metodologias para a formação de complexos entre a β -lapachona /dendrímero (BLD) e β -lapachona /cucurbiturila (BLC), visando o aumento da solubilidade deste fármaco através de interações intermoleculares e suas respectivas caracterizações físico-químicas. O complexo com o dendrímero foi preparado a partir de uma relação massa/massa de 3(fármaco):1 (carreador) variando o tempo de adsorção de 1, 3 e 7 dias. Para os complexos com a cucurbiturila uma relação molar 1:1 foi estabelecida para a formação dos complexos de inclusão com BL, variando o período de adsorção em 1, 3 e 7 dias. Após o período de agitação, os complexos BLD e BLC foram evaporados e secos a temperatura ambiente para posterior caracterização. Os complexos obtidos foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência, ultravioleta na região do visível, espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, análise termogravimétrica, análise calorimétrica diferencial, difratometria de raio-X e microscopia eletrônica de varredura. Para o complexo BLD ficou evidente que a variação no tempo de adsorção não interferiu na quantidade de produto formado ou nas propriedades do complexo obtido. Os resultados das caracterizações mostram que o BLDD1 e o BLCD1 foram formados de acordo com os dados espectroscópicos e espectrométricos que demonstram variações nos sinais de BL quando complexado. Houve uma mudança na cristalinidade da BL, a qual era bastante cristalina, para um material mais amorfo com morfologia distinta do fármaco isolado. Os resultados das caracterizações térmicas exibiram, para os complexos, uma maior estabilidade térmica da β -lap complexada (BLDD e BLCD) e menor energia de fusão, quando comparado com β -lapachona livre. Essas informações também sugerem uma diminuição na cristalinidade do complexo o que é indicativo para o incremento de solubilidade. Desta forma propôs-se a caracterização físico-química como um indício de melhoria na solubilidade da β -lapachona através da formação de complexos entre BL e dois carreadores distintos e suas contribuições para estudos de uma possível formulação farmacêutica futura.

Palavras-chave: *Tabebuia avellanedae*. Ipê-rôxo. Solubilidade. β -lapachona. Complexo de inclusão.

ABSTRACT

The β -naphthoquinone lapachol is a (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b]pyran-5,6-dione) molecular weight of 243,3g / mol present in *Tabebuia avellanedae* Lor, tree known as purple ipe or pau d'purple bow. This naphthoquinone is a substance that can be obtained by semi-synthesis from lapachol well as lomatiol. This bioactive has multiple pharmacological effects such as antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory and anti-proliferative. According to biopharmaceutical classification system, the β -lapachone (BL or β -LAP) is classified as class II presenting low solubility and high permeability. Thus, an increase aqueous solubility study is necessary. The aim of this study was to characterize chemically-physical proposed complexes using two polymers: the bis-MPA dendrimer (DEN) and cucurbit[6]uril (CUC). This study shows two methods for the formation of complexes between β -lapachone / dendrimer (BLD) and β -lapachone / cucurbituril (BLC), in order to increase the solubility of the drug through intermolecular interactions and their physicochemical characterizations. The complex with the dendrimer was prepared from a mass / mass 3 (drug): 1 (carrier) varying the time for adsorption of 1, 3 and 7 days. For cucurbituril complexes with a molar ratio of 1: 1 was established for the formation of inclusion complexes with BL varying the adsorption period at 1, 3 and 7 days. After the stirring period, the BLC and BLD complexes were evaporated and dried at room temperature for further characterization. The obtained compounds were characterized by high-performance liquid chromatography, ultraviolet into the visible region spectroscopy, vibrational absorption in the infrared, nuclear magnetic resonance spectrometry of hydrogen, thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction and electron microscopy scanning. For BLD complex it was evident that the variation in the adsorption time not interfere in the amount of complex formed or the product properties obtained. The results of the characterizations show that BLDD1 and BLCD1 were formed in accordance with spectroscopic and spectrometric data showing variations in signals when complexed BL. There was a change in the crystallinity of the BL, which was very clear, to a more amorphous material with distinct morphology of the drug alone. The results showed the thermal characterizations for the complex, greater thermal stability of the complexed β -LAP (BLDD and BLCD) and less fusion energy, compared with β -lapachone free. This information also suggests a decrease in crystallinity of the complex which is an indication to increase solubility. Thus it was proposed to physicochemical characterization as a better indication of the solubility of β -lapachone by forming complexes between BL and two different carriers and their contributions to studies of possible future pharmaceutical formulation.

Keywords: *Tabebuia avellanedae*. Purple-ipe. Solubility. β -lapachone. Inclusion complex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de um ipê-roxo.	21
Figura 2. Estrutura da β -lapachona.	21
Figura 3. Estruturas das naftoquinona.	22
Figura 4. Estrutura geral da ciclodextrina, evidenciando a superfície externa hidrofílica e a interna, hidrofóbica.	26
Figura 5. Esquemática da estrutura geral de um dendrímero.	27
Figura 6. Dendrímeros poli-L-lisina (1), poli (propilenoimina) PPI (2) e poli (amidoamina) PAMAM (3) e o dendrímero <i>bis</i> -MPA.	29
Figura 7. Método divergente de crescimento de um dendrímero.	31
Figura 8. Método convergente de crescimento de um dendrímero.	31
Figura 9. Anti-inflamatório já encapsulados em dendrímeros.	33
Figura 10 Estrutura química da cucurbit[6]urila.	33
Figura 11. Ilustração das cucurbit[5]urila, cucurbit[6]urila e cucurbit[8]urila	34
Figura 12. Espectro de absorção na região de infravermelho da β -lapachona.	40
Figura 13. Espectro de absorção na região de infravermelho do dendrímero <i>bis</i> -MPA.	41
Figura 14. Espectro de absorção na região de infravermelho da cucurbit[6]urila hidratada.	42
Figura 15. Espectro de absorção na região de infravermelho para o sistema BLDD1	44
Figura 16. Espectro de absorção na região de infravermelho do sistema BLCD1	45
Figura 17. Espectro de absorção na região de infravermelho sobrepostos: BLAP; CUC e BLCD1.	46
Figura 18. Espectro de RMN 1H da β -lapachona em DMSO-d ₆ .	47
Figura 19. Espectro de RMN 1H do dendrímero <i>bis</i> -MPA..	49
Figura 20. Ampliação dos sinais da região de aromático da β -lapachona livre e complexada.	50
Figura 21. Ampliação dos sinais sobrepostos dos complexos BLDD's, DEN e da BLAP	51

Figura 22. Ampliação dos sinais na região de aromático sobrepostos do complexo BLCD e da BLAP.	52
Figura 23. Possibilidades de interação para o complexo BLCD1 1:1	52
Figura 24. Possíveis mecanismos de interações para os complexos BLDD's.	53
Figura 25. Difratoograma de raio-X da β -lapachona.	53
Figura 26. Difratoograma de raio-X do dendrímero <i>bis</i> -MPA.	54
Figura 27. Difratoograma de raio-X do complexo BLDD3.	54
Figura 28. Difratoogramas sobrepostos dos BLAP, DEN e BLDD's.	55
Figura 29. Difratoograma de raio-X da cucurbit[6]urila.	56
Figura 30. Difratoogramas da BLAP, CUC, BLCD1 1:1 e 1:2.	56
Figura 31. Imagem da BLAP nas magnificações de 800x e 3000x.	57
Figura 32. Imagens do <i>bis</i> -MPA nas magnificações de 800x e 3000x.	58
Figura 33. Imagens do BLDD1 nas magnificações de 800x e 3000x.	58
Figura 34. Imagens da CUC nas magnificações de 800x e 3000x.	59
Figura 35. Imagens do complexo BLCD1 1:1 nas magnificações de 800x e 3000x	59
Figura 36. DSC fotovisual: momento exato do processo de fusão da BLAP	60
Figura 37. Termograma da BLAP	60
Figura 38. Termograma do polímero hiper-ramificado <i>bis</i> -MPA.	61
Figura 39. Termograma da cucurbit[6]urila.	62
Figura 40. Sobreposição das análises termogravimétricas de BLAP, DEN e dos complexos BLDD1, 3 e 7.	62
Figura 41. Sobreposição das análises termogravimétricas de BLAP, CUC e dos complexos BLCD 1:1 e 1:2.	63
Figura 42. Curva DSC da BLAP.	64
Figura 43. Curva DSC do polímero <i>bis</i> -MPA.	65
Figura 44. Curva DSC da cucurbit[6]urila.	65
Figura 45. Curvas de DSC dos complexos BLDD's, BLAP e DEN.	66
Figura 46. DSC dos complexos BLCD's, BLAP e CUC.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais picos de <i>bis</i> -MPA.	48
Tabela 2. Deslocamentos químicos dos prótons de BLAP e suas variações quando no complexo BLDD1.	50
Tabela 3. Deslocamentos químicos dos prótons de DEN e suas variações quando no complexo BLDD1.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

FTIR – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

RMN ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

DRX- Difração de raios-X

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

g.mol⁻¹ – Grama por mol

M – Concentração molar em mol.L⁻¹

mM – Milimolar (mmol.L⁻¹);

δ - Deslocamento químico em ppm

Hz - Hertz

s - Singleto

d - Dupleto

dd - Duplo dupleto

t - Tripleto

qt - Quadrupleto

ddt - Duplo duplo tripleto

m - Multipleto

J - Constante de acoplamento

ppm - Parte por milhão

PVP-K 30 – Polivinilpirrolidona – K 30

PEG 4000 – Polietilenoglicol 4000

HP β CD - Hidroxipropil- β -ciclodextrina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AZT - (3'-azido-3'-deoxitimidine)

AINE's - Anti-inflamatórios não esteroidais

bis-MPA - Polímero hiper-ramificado derivado do ácido 2,2-*bis*(hidroximetil) propanóico

BL, BLAP ou β -lap - β -lapachona

DEN – dendrímeros

BLD - β -lapachona /dendrímero

BLDD1 - β -lapachona /dendrímero /um dia.

BLDD3 - β -lapachona /dendrímero /três dias.

BLDD7 - β -lapachona /dendrímero /sete dias.

CUC – cucurbit[6]urila ou cucurbiturila

BLC - β -lapachona /cucurbiturila

BLCD1 - β -lapachona /cucurbiturila /um dia.

BLCD3 - β -lapachona /cucurbiturila /três dia.

BLCD7 - β -lapachona /cucurbiturila /sete dia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 β -LAPACHONA	20
3.2 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA β -LAPACHONA	22
3.3 INCREMENTO DE SOLUBILIDADE DO FÁRMACO β -LAPACHONA	25
3.4 CICLODEXTRINAS	26
3.5 DENDRÍMEROS	27
3.5 SÍNTESES DE DENDRÍMEROS	30
3.5.1 MÉTODOS DE SÍNTESE	30
3.6 APLICAÇÕES DOS DENDRÍMEROS	31
3.7 CURCUBITURILAS	33
3.8 CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS	34
3.8.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	35
3.8.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X	35
3.8.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	36
4. PARTE EXPERIMENTAL	38
4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS	38
4.2 METODOLOGIA	38
4.1.2 COMPLEXOS COM O DENDRÍMERO (BLDD)	38
4.1.2 COMPLEXOS COM A CUCURBIT[6]URILA HIDRATADA (BLCD)	39
4.2 RESULTADOS DE DISCUSSÃO	39
4.2.1 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	39
4.2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN ^1H)	46
4.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	53
4.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	57

4.2.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (ATG)	60
4.2.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA	63
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A β -lapachona, quimicamente conhecida por (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) é uma substância simples do grupo das naftoquinona, é um produto extraído da *Tabebuia avellanedae* Lor, árvore tropical conhecida como ipê roxo ou pau d'arco roxo, da família *Bignoniaceae*, de ocorrência muito comum nas florestas tropicais do Brasil. Esta naftoquinona é uma substância natural que pode ser facilmente obtida por uma semi-síntese a partir do lapachol (LIMA et al., 1962; SIMÕES et al., 2003; PINTO e COSTA, 2009).

A β -Lap tem grande importância na química Medicinal por apresentar várias atividades biológicas tais como atividades antiparasitárias (WILLCOX e GILBERT, 2009; AIRES et al., 2014; SOUZA-SILVA et al., 2015), anti-inflamatória (SITÔNIO et al., 2013) e também anti-câncer (SIEGEL et al., 2012), o seu principal alvo terapêutico. Acerca do seu potencial contra o câncer, diversos processos biológicos já foram estudados tais como apoptose (LEE et al., 2011), necrose (SUN et al., 2006) ou autofagia (PARK et al., 2011) observadas em células tratadas com esse composto. Além disso, há evidências que a β -lapachona também possa ter a capacidade de interferir na atuação da DNA topoisomerase I (PARDEE et al., 2002), DNA topoisomerase II (KRISHNAN et al., 2001) e MAP quinase (LIEN et al., 2008).

No entanto, apesar dos inúmeros trabalhos que comprovam o potencial terapêutico da β -lapachona, este ativo nunca chegou a ser comercializado devido à dificuldade de obtenção de uma forma farmacêutica estável. Um dos grandes problemas observados é a sua baixa solubilidade em água (0.038 mg/mL ou 0.16 mM) e a distribuição não específica da β -lapachona nos tecidos (NASONGKLA et al., 2003; ALVES et al., 2004).

Existem diversas formas de aumentar a solubilidade de um fármaco. Dentre elas pode-se citar: modificações químicas, aumento da área superficial de dissolução, dispersões sólidas e complexação à diversos polímeros (LEUNER et al., 2000). Dessas alternativas, a complexação da β -lapachona à polímeros ganham destaque, onde estudos envolvendo o incremento de solubilidade com PVP-K 30, PEG 4000 e as ciclodextrinas (hidroxipropil- β -ciclodextrina - HP β CD) apresentam

resultados promissores quando comparados ao fármaco isolado (PRESMICH, 2009). O uso da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) para formular β -lapachona aumentou a solubilidade do fármaco em ~400 vezes. No entanto, uma rápida depuração do fármaco no sangue ($t_{1/2}$ = 24 minutos), limita o seu sucesso como um agente terapêutico em ensaios clínicos (BLANCO et al, 2010).

Os dendrímeros e as cucurbiturilas mostram-se como estruturas promissoras no desenvolvimento e no sistema de distribuição de fármacos, visando a diminuição da dose administrada e uma maior eficácia terapêutica. Fármacos como AZT (3'-azido-3'-deoxitimidine), um antirretroviral e também alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) têm sido complexados com sucesso com poliamidoamina (dendrímero) (MILLER et al., 1998; GUPTA, AGASHE e JAIN, 2007) e a isoprenalina, um fármaco utilizado para arritmias cardíacas, complexada a cucurbit[6]urila (DANYLYUK, FEDINB e SASHUKA, 2013), são exemplos do emprego desses polímeros.

Sendo assim, diante das evidências da potencialidade farmacológica da β -lapachona que esbarra na baixa solubilidade aquosa do fármaco reduzindo a sua farmacocinética, este trabalho vem oferecer novas alternativas de complexação ao dendrímero *bis*-MPA e a cucurbit[6]urila, a fim de promover o incremento de solubilidade da β -lapachona.

SOMETHING



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar os potenciais carreadores de fármacos, dendrímero *bis*-MPA e hidrato de cucurbiturila, como uma alternativa para incremento de solubilidade da β -lapachona em meio aquoso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar encapsulamento da β -lapachona em dois carreadores distintos dendrímero e hidrato de cucurbiturila;
- ✓ Caracterizar estruturalmente a β -lapachona e os complexos obtidos à partir de dois carreadores distintos (dendrímero e hidrato de cucurbiturila) através de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), difração de Raio X, e análises calorimétrica (DSC) e gravimétricas (TG);
- ✓ Avaliar o mecanismo de interação entre os carreadores utilizados e a β -lapachona;
- ✓ Avaliar as alterações morfológicas causadas pela formação dos complexos obtidos com β -lapachona e os carreadores dendrímero *bis*-mpa e cucurbit[6]urila.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

Durante milhares de anos, a humanidade utilizava as plantas medicinais com finalidade terapêutica. O conhecimento e a informação etnofarmacológico acumulado ao longo da nossa evolução e os avanços científicos envolvendo os estudos farmacológicos culminaram com o desenvolvimento de fármacos de grande importância na terapêutica atual, como, a atropina, ácido salicílico, cafeína, pilocarpina, taxol, digoxina, morfina, vincristina, vimblastina (ALVES et al., 2001).

Segundo a ANVISA, os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validados através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase III. Já os fitofármacos são substâncias isoladas a partir da matéria-prima vegetal e utilizadas como ativo em medicamentos com propriedades paliativas, curativas ou para fins de diagnóstico (BRASIL, 2004).

3.1 β -LAPACHONA

Nesse contexto, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados com a β -lapachona, produto extraído da *Tabebuia avellanedae* Lor, árvore tropical conhecida como ipê roxo ou pau d'arco roxo, da família *Bignoniaceae*, de ocorrência muito comum nas florestas tropicais do Brasil (Figura 1). Esta naftoquinona é uma substância natural que pode ser facilmente obtida por uma semi-síntese a partir do lapachol (LIMA et al., 1962)



Figura 1. Árvore do ipê-roxo.

A β -lapachona, quimicamente conhecida por (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) é uma substância simples do grupo das naftoquinonas, com peso molecular de $242,3 \text{ g.mol}^{-1}$ e estruturalmente estável em pH variando de 3 a 9 (Figura 2).

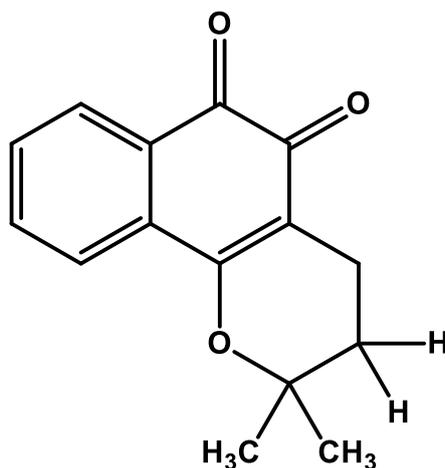


Figura 2. Estrutura química da β -lapachona

As naftoquinonas são substâncias relacionadas com o sistema naftalênico. Quando duas carbonilas estão nas posições 1,2 do anel naftaleno são chamadas de *o*-naftoquinonas e quando nas posições 1,4 de *p*-naftoquinonas (Figura 3). Estão

disseminadas no reino vegetal e, devido às suas propriedades redox, podem interferir em diferentes processos oxidativos biológicos. Apresentam geralmente estrutura cristalina de cor amarela e vermelha, sendo amplamente distribuídas na natureza (SIMÕES et al., 2003).

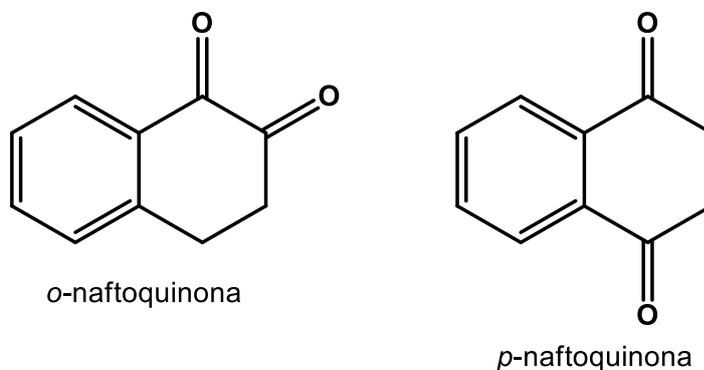


Figura 3. Estruturas químicas das orto e para-naftoquinonas.

3.2 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA β -LAPACHONA

A β -Lap tem grande importância na química Medicinal por apresentar várias atividades terapêuticas tais como atividades anti-câncer (SIEGEL et al, 2012), esquistossomicida (AIRES et al., 2014), anti-malária (WILLCOX e GILBERT, 2009), leishmanicida (SOUZA-SILVA et al, 2015), tripanocida (MENNA-BARRETO et al., 2005; CARDOSO et al., 2015), antibacteriana (PEREIRA et al., 2006), antifúngica (MEDEIROS et al., 2009), antiviral (FÁVARO et al., 1990), anti-inflamatória (DONG-OH et al., 2007; SITÔNIO et al., 2013) e particularmente a anticancerígena (DONG-OH et al., 2010), seu principal alvo terapêutico. Devido a comprovação de seu promissor potencial terapêutico, foi realizado o estudo clínico fase II para o tratamento de câncer pancreático, com o aparecimento de resultados promissores (BENTLE et al., 2006).

Estudos vêm demonstrando a capacidade esquistossomicida da β -lapachona, uma vez que a mesma tem a capacidade de bloquear a penetração das cercarias, fase infectante da esquistossomose mansônica, em camundongos (ZHANG e COULTAS, 2013). Outros trabalhos demonstram que a β -Lap também apresenta atividade frente aos vermes adultos (AIRES et al., 2014) além de apresentar efeito

moluscicida, causando danos ao hospedeiro intermediário da parasitose, o caramujo do gênero *Biomphalaria* (RIBEIRO et al., 2009).

Além do helminto *S. mansoni* citado acima, também existem protozoários responsáveis por causar doenças consideradas negligenciadas tais como a leishmaniose, malária e a doença de chagas. Essas parasitoses possuem prevalência mundial principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, apresentando grande número de casos nos países em desenvolvimento (SOUZA-SILVA et al., 2015; ANDRADE-NETO et al., 2004; FERREIRA et al., 2011).

A leishmaniose acomete mais de 1,3 milhões de casos com aproximadamente 20 mil mortes por ano em todo o território mundial (WHO, 2015). Os parasitos do gênero *Leishmania* são responsáveis por um quadro clínico caracterizado pela leishmaniose cutânea podendo afetar pele, mucosa e cartilagens, bem como pela leishmaniose visceral, ocasionando danos a tecidos e órgãos, tais como fígado, baço e medula óssea (READY, 2014).

No Brasil, o parasito *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é a espécie caracterizada por causar um largo espectro de manifestações clínicas (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007). O tratamento dessa parasitose é realizado através de compostos antimoniais, fármacos de primeira escolha para a terapêutica (DEPS et al., 2000). Além dos antimoniais, existem compostos atribuídos como fármacos de segunda escolha, tais como a pentamidina e anfotericina B (SALDANHA et al., 1999).

A malária é uma parasitose de grande importância devido à imensa distribuição geográfica de casos de pessoas infectadas pelo mundo inteiro (HARVEY et al., 2013). É uma infecção causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, onde o tratamento é realizado através do fármaco cloroquina, composto que se destaca na atividade anti-malárica, apesar de estar apresentando ineficiência devido ao surgimento de cepas resistentes (HAHN e POTTINGER, 2016).

Outro protozoário importante seria o *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de chagas, parasitose caracterizada por desencadear manifestações clínicas peculiares no paciente infectado (CARLIER, 2007). O fármaco tripanocida utilizado atualmente é o Benzonidazol, eficaz na fase aguda da parasitose e apresentando

controvérsias quanto a sua atuação parasitária na fase crônica (COURA e CASTRO, 2002).

. Como já visto anteriormente, todos esses compostos enquadrados como potentes agentes leishmanicidas, antimaláricos e tripanocidas apresentam muitas limitações quanto a sua utilização tais como alto custo, toxicidade, dificuldade de administração e, além disso, o surgimento de cepas resistentes a esses fármacos (AMEEN, 2010).

Dessa maneira, há a necessidade da busca de novos agentes terapêuticos que demonstrem atividades leishmanicida, anti-malárica e tripanocida satisfatórias além de sanar todas as limitações já vistas anteriormente (SOUZA-SILVA et al., 2015). Relativo a isso, estudos recentes vêm demonstrando a β -lapachona e seus derivados como candidatos a fármacos antiparasitários devido a sua capacidade de promover a inibição da enzima proteinase serina, classificada como um potente fator de virulência para os demais parasitos (SILVA-ALMEIDA et al., 2012; SHARMA et al., 2013; MONZOTE e SIDDIQ, 2011).

Além das atividades da β -lapachona frente aos parasitos já comentados acima, esse composto também vem apresentando atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* (MACEDO et al., 2013), sendo de grande importância uma vez que alguns antibióticos como a meticilina vêm apresentando diminuição da eficácia devido ao surgimento de resistência dessas espécies (JOHARI et al., 2012). As naftoquinonas, inclusive a β -lapachona tem a capacidade de aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio, causando danos aos lipídios, proteínas e ácidos desoxirribonucléicos encontrados nos microrganismos (COWAN, 1999).

A β -lapachona também vem se destacando frente à atividade anticancerígena. No entanto, o mecanismo de ação ainda continua desconhecido. Porém, várias hipóteses acerca disso já foram estudadas e classificados como possíveis alvos, tais como apoptose (LEE et al., 2011), necrose (SUN et al., 2006) ou autofagia (PARK et al., 2011) observadas em células tratadas com esse composto. Além disso, há evidências que a β -lapachona também possa ter a capacidade de interferir na atuação da DNA topoisomerase I (PARDEE et al., 2002), DNA topoisomerase II (KRISHNAN et al., 2001) e MAP quinase (LIEN et al., 2008).

3.3 INCREMENTO DE SOLUBILIDADE DO FÁRMACO β -LAPACHONA

Apesar dos inúmeros trabalhos que comprovam o potencial terapêutico deste fitofármaco, este ativo nunca chegou a ser comercializado devido à dificuldade de obtenção de uma forma farmacêutica estável. Um dos grandes problemas observados é a sua baixa solubilidade em água. (ALVES et al., 2004)

A solubilidade de um fármaco é um dos fatores determinantes para a sua biodisponibilidade quando administrados por via oral. Existem diversas formas de aumentar a solubilidade de um fármaco. Dentre elas pode-se citar: modificações químicas, complexação, aumento da área superficial de dissolução e dispersões sólidas (LEUNER et al., 2000).

Dentre os métodos de incremento da solubilidade da β -lapachona, temos na literatura o desenvolvimento de dispersões sólidas com PVP-K 30 e PEG 4000 e a complexação com ciclodextrinas que apresentam resultados promissores quando comparados ao fármaco isolado (PRESMICH, 2009).

Como discutido anteriormente, a β -lapachona possui importantes aplicações farmacológicas. No entanto, a baixa hidrossolubilidade (0.038 mg/mL ou 0.16 mM) e a distribuição não específica da β -lapachona nos tecidos, limita o seu potencial para ensaios clínicos (NASONGKLA et al., 2003). Sendo assim, diversas alternativas farmacocinéticas vêm sendo aplicadas com o intuito de aumentar a solubilidade aquosa desse derivado naftoquinônico.

3.4 CICLODEXTRINAS

A utilização de complexos de inclusão β -ciclodextrina tem sido útil na tentativa de reverter esse problema. As ciclodextrinas (CD's) são oligossacarídeos cíclicos capazes de formar um complexo de inclusão estável com uma grande variedade de fármacos (ARAÚJO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2008a). As β -ciclodextrinas são compostas por sete unidades de α -D-glicopiranosídeo dispostas de tal maneira que a cavidade mais larga consiste de grupos hidroxil secundários e a cavidade menor,

grupos hidroxil primários. É típico um toroide com a superfície exterior hidrofílica e uma cavidade central hidrofóbica (Figura 4) (DUCHENE, 1987).

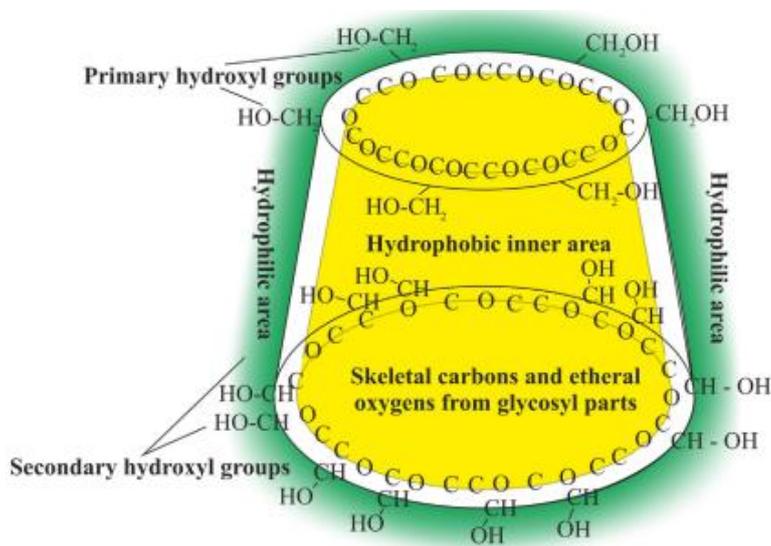


Figura 4. Estrutura geral da ciclodextrina, evidenciando a superfície externa hidrofílica e a interna, hidrofóbica.

O uso da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) para formular β -lapachona aumentou a solubilidade do fármaco em ~400 vezes. No entanto, uma rápida depuração do fármaco no sangue ($t_{1/2}$ = 24 minutos), hemólise devido ao transportador HP β CD e metemoglobinemia induzida pela β -lapachona foram notadas, limitando o seu sucesso como um agente terapêutico em ensaios clínicos (BLANCO et al, 2010).

Sabendo-se que as ciclodextrinas aumentam consideravelmente a solubilidade aquosa da β -lap, e com o objetivo de contornar os efeitos negativos da utilização exclusiva desse complexo de inclusão, outros estudos foram realizados. O aprisionamento de complexos de inclusão em sistemas de liberação, tais como lipossomas, podem modular a dissociação *in vivo* do complexo fármaco:CD, contribuindo assim para uma melhoria no perfil farmacocinético dos fármacos (LIRA et al., 2009). O estudo de Cavalcanti et al. (2011), envolvendo cinética de liberação *in vitro* desse sistema de carreamento, revelou que a liberação da β -lapachona a partir do complexo de inclusão β -lap: HP β CD incorporado a cavidade aquosa do lipossoma foi relativamente maior do que o complexo β -lap:lipossoma

(aproximadamente 40% nas primeiras 4 horas). Desse modo, o autor afirma que houve uma liberação controlada da β -lap e que este sistema de carreamento seria eficaz para o tratamento farmacológico, evitando doses repetidas e o surgimento de efeitos adversos.

3.5 DENDRÍMEROS

As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm despertado maior atenção em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001). Um dos candidatos mais promissores no campo da nanotecnologia é o dendrímero devido à sua forma bem definida, o tamanho e estrutura (KLAJNERT e BRYSEWSKA, 2007). A expressão dendrímero é derivado de um termo grego “dendron” que significa "árvore", tendo em conta a sua estrutura típica com um número de unidades de ramificação e um núcleo (Figura 5).

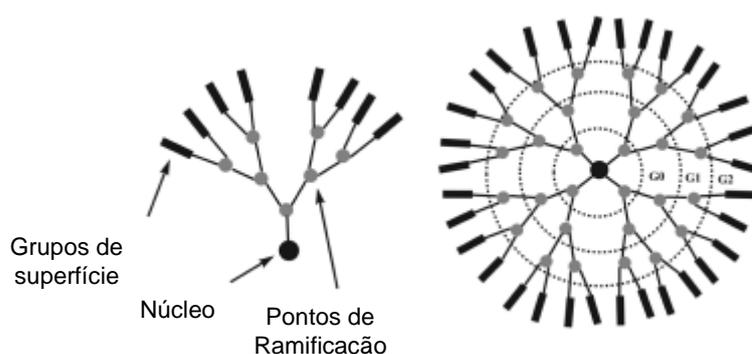


Figura 5. Esquemática da estrutura geral de um dendrímero.

Os dendrímeros são polímeros globulares altamente ramificados, com cerca de 1-10 nm. Os primeiros estudos envolvendo dendrímero são relatados na década de 1970. (VOGTLE, 1978, ELHAM et al., 2014)). A palavra dendrímero é de origem grega onde “dendron” significa árvore e meros significa ramos ou parte. Enquanto os polímeros tradicionais apresentam uma massa molecular indefinida, os dendrímeros,

apesar do seu tamanho molecular grande possuem uma arquitetura polimérica bem definida, e com baixa polidispersidade e possibilita elevada funcionalização (RUTH e LORELLA, 2005; JANG et al., 2009; ELHAM et al., 2014).

Os dendrímeros consistem em três unidades estruturais, ou seja, o núcleo, as unidades de ramificação e um número de grupos terminais. Grupos terminais podem possuir cargas positivas, negativas ou neutras, que são vitais na exploração de dendrímeros como veículos de distribuição de fármacos. Esta polivalência pode desempenhar um importante papel na aplicação farmacológica visto que dendrímeros catiônicos como poli-*L*-lisina, poli (amidoamina) PAMAM e poli (propilenoimina) PPI (Figura 6), podem formar complexos com DNA. As cargas positivas dos dendrímeros podem facilitar a sua interação com membranas biológicas carregadas negativamente que conduzem a aplicabilidade de dendrímeros para entrega de fármacos no meio intracelular. Por outro lado, a polivalência dos dendrímeros também conduzem às toxicidades, incluindo citotoxicidade, hemólise etc. (MALIK et al., 2000; JAIN et al., 2010).

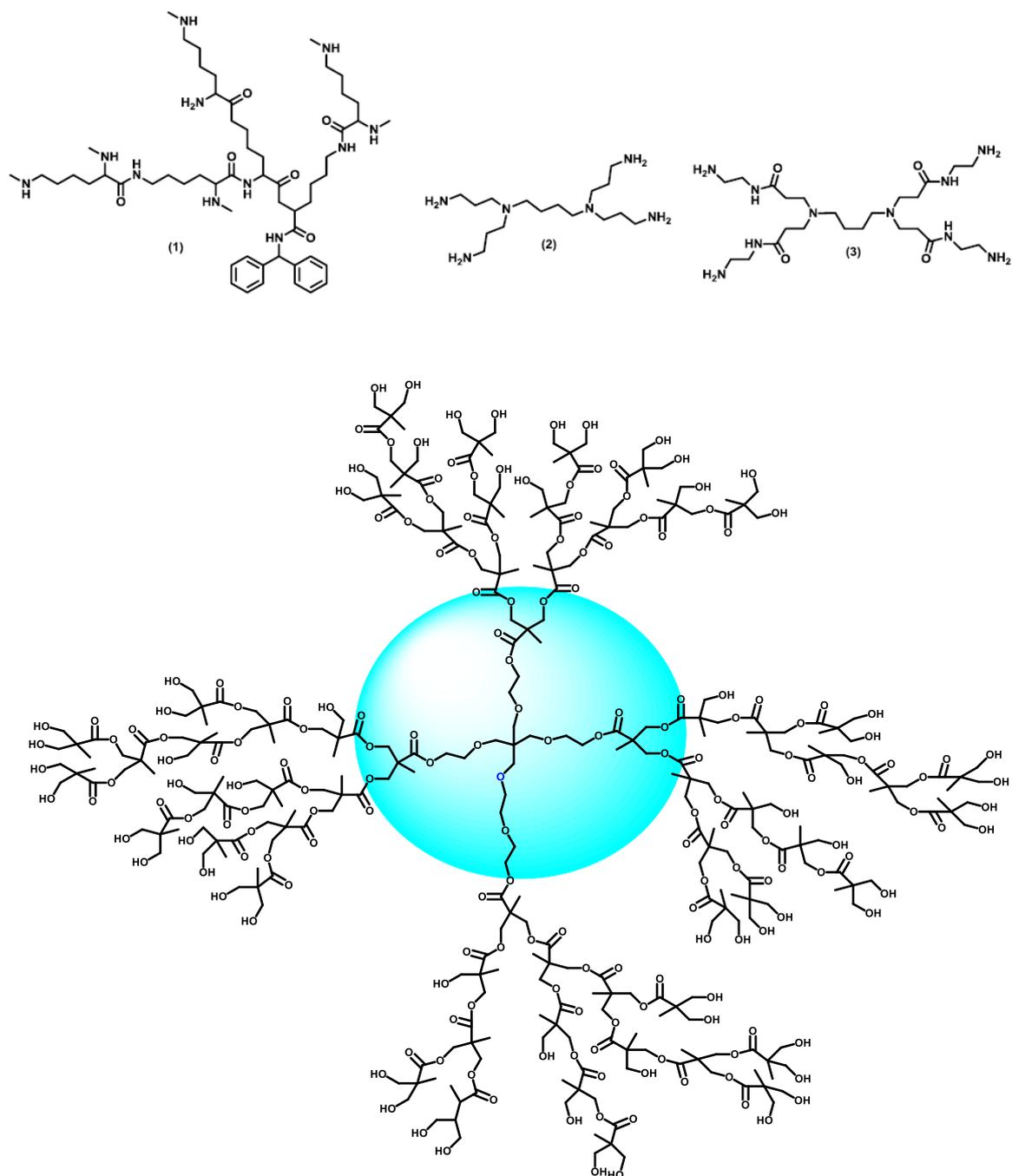


Figura 6. Dendrímeros poli-*L*-lisina (1), poli (propilenoimina) PPI (2) e poli (amidoamina) PAMAM (3) e o dendrímero *bis*-MPA.

Os dendrímeros são polímeros multifuncionais onde as funções aminas e amidas estão bastantes presentes. Dentre um grande número de polímeros existentes, os baseados no ácido 2,2-bismetilopropiônico (*bis*-MPA) têm atraído grande interesse da pesquisa, visto que este monômero alifático simples é a unidade

básica de várias outras macromoléculas dendríticas atualmente em uso, incluindo os polímeros de cadeia hiperamificada. (CARLMARK et al., 2013). A presença de ligações hidrolisáveis na estrutura do polímero, tais como as ligações de éster e carbonato no *bis*-MPA, permite a sua degradação em subprodutos metabólicos que podem ser reabsorvidos pelo organismo ou excretados como subprodutos atóxicos (FELIU et al., 2012).

3.5 SÍNTESES DE DENDRÍMEROS

A síntese de dendrímeros está relacionada com a química molecular e devido a sua obtenção controlada assemelha-se a repetição de monómeros (BOSMAN, JANSSEN e MEIJER, 1999; NEWKOME, MOOREFIELD e VÖGTLE, 2001). A obtenção de dendrímeros oferece a oportunidade de gerar arquiteturas macromoleculares controladas com estrutura semelhante aos observados em sistemas biológicos (TOMALIA, 2004). Dendrimeros são geralmente preparadas utilizando quer um método divergente ou um método convergente (HODGE, 1993). Nos diferentes métodos, o dendrímero cresce para fora de um núcleo molecular multifuncional. A molécula do núcleo reage com moléculas do monómero contendo um reativo e dois grupos latentes, dando ao dendrímero de primeira geração. Então, a nova periferia da molécula é ativada para reações com mais monómeros.

3.5.1 MÉTODOS DE SÍNTESE

No método divergente os dendrímeros se iniciam a partir do núcleo central, que através das rotas sintéticas repetidas aumentam as ramificações de geração em geração em direção à periferia. Portanto este método caracteriza-se como se o dendrímero estivesse sendo construído de dentro para fora (Figura 7). A vantagem deste método é a rapidez na obtenção. Contudo, a principal desvantagem será as prováveis imperfeições que poderão serem formadas (ELHAM et al., 2014).

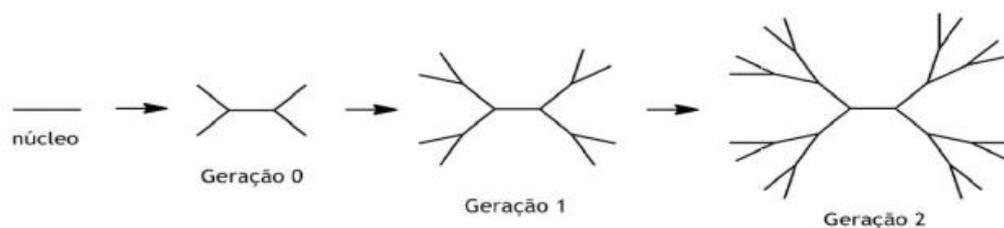


Figura 7. Método divergente de crescimento de um dendrímero.

Para o método convergente obtenção ocorre a partir das partes externas (região periférica) em direção ao núcleo. Inicialmente são preparadas diversas unidades de “dendrons”, que nas etapas subsequentes serão unidas até o núcleo central (Figura 8). Como as unidades de “dendrons” são obtidas separadamente este método permite um número maior de reações de acoplamento diminuindo a possibilidade de imperfeições estruturais. A principal desvantagem seria gerar dendrímeros com alta ordem de gerações, pois a reação ao núcleo fica muito congestionada, e fazendo com que os rendimentos de síntese sejam consideravelmente menores (DEYUE, CHAO e HOLGER, 2003).

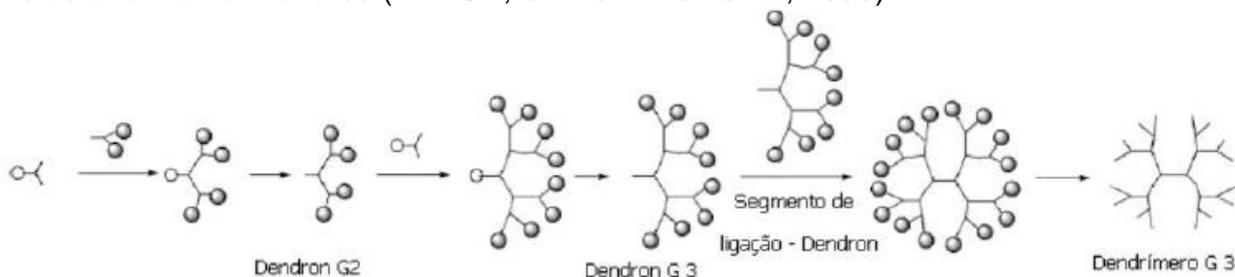


Figura 8. Método convergente de crescimento de um dendrímero.

3.6 APLICAÇÕES DOS DENDRÍMEROS

Esses polímeros dendríticos têm sido reportados como detentores de algumas atribuições como aplicações químicas (PARK et al., 2009), sensores elétricos (KOO et al., 2001), revestimento e aditivos para polímeros (HARTMANN-THOMPSON et al., 2009) e veículos de distribuição de fármacos (CHENG et al., 2011). Dessa maneira, os dendrímeros se mostram como estruturas promissoras no desenvolvimento e no sistema de distribuição de fármacos, visando a diminuição da dose administrada e uma maior eficácia terapêutica.

A encapsulação de substâncias no interior no núcleo do dendrímero pode possibilitar a proteção e controlar a liberação, por apresentar baixa imunogenicidade,

além do direcionamento do fármaco até o alvo biológico. Outro ponto de destaque é a sua característica de solubilidade em água, com isso favorece aplicações para fins biológicos (RUTH e LORELLA, 2005; JANG et al., 2009; ELHAM et al., 2014).

A ramificação linear apresentada pelos dendrímeros é responsável pela formação de lacunas entre as cadeias moleculares permitindo um espaço flexível, onde os fármacos podem ser incorporados. As funcionalidades presentes na periferia dos dendrímeros são de mais fácil acesso, e podem ser modificadas. Isso permite que essa porção destes materiais esteja mais susceptível ao ambiente externo, e definindo propriedades físico-químicas e macroscópicas interessantes. Diferentemente de alguns polímeros convencionais, onde cadeias lineares são observadas, os dendrímeros podem apresentar propriedades únicas, devido às suas características provenientes de seu arranjo na estrutura tridimensional, podendo ser utilizados em vários tipos de aplicações.

Alguns fármacos relatados na literatura e utilizados na clínica foram encapsulados em dendrímeros como polímeros a fim de melhorar o perfil farmacocinético. Um exemplo claro é o AZT (3'-azido-3'-deoxitimidine), um fármaco antirretroviral e também alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) que têm sido complexado com sucesso com PAMAM, como por exemplo, aspirina, indometacina, flurbiprofeno, cetoprofeno, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) (Figura 9) (MILLER et al., 1998; GUPTA, AGASHE e JAIN, 2007).

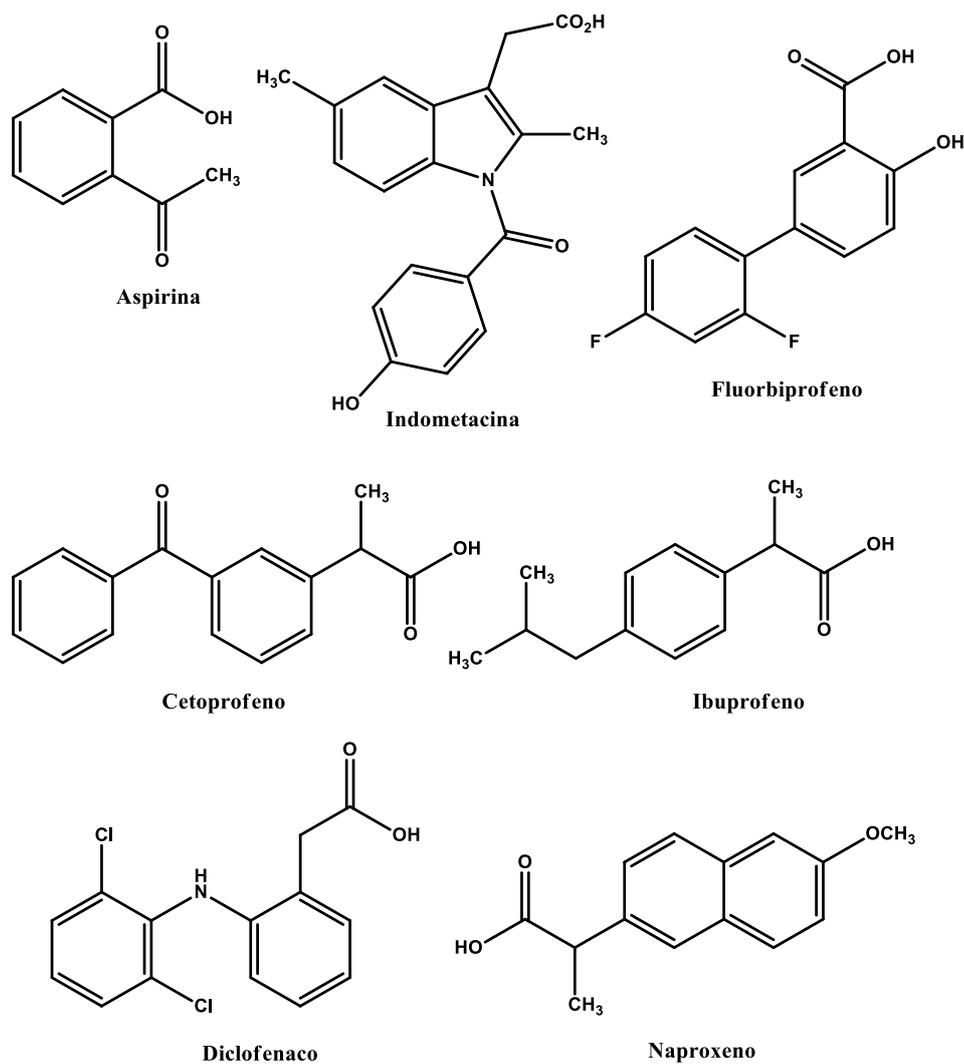


Figura 9. Anti-inflamatório já encapsulados em dendrímeros.

3.7 CURCUBITURILAS

Outra estrutura estudada foram as curcubiturilas que são estruturas cíclicas toroidais (Figura 10), compostas por unidades de glicolurila, ligadas por grupos -CH₂ - em suas aminas de simetria.

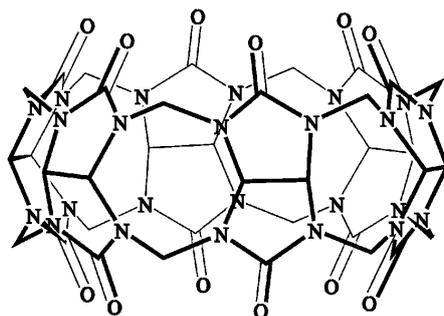


Figura 10 Estrutura química da cucurbit[6]urila.

Esta estrutura, além de ser simétrica, possui uma cavidade central hidrofóbica relativamente grande, que é capaz de acomodar espécies variadas para a formação de compostos de inclusão, como o fazem outras famílias como as ciclodextrinas. Existem três tipos diferentes de cucurbiturila: cucurbit[5]urila, cucurbit[6]urila e cucurbit[8]urila, onde a mais utilizada é a seis (6) (Figura 11). Na cucurbit[6]urila, existem 12 carbonilas orientadas para fora das cavidades, 6 de cada lado, formando assim dois portais para as cavidades. Essas espécies também são amplamente empregadas para a melhoria do perfil farmacocinético de fármacos, como por exemplo a formação do complexo hóspede-hospedeiro entre a cucurbit[6]urila e a isoprenalina, um fármaco utilizado para arritmias cardíacas (DEMETS, 2007; DANYLYUK, FEDINB e SASHUKA, 2013).

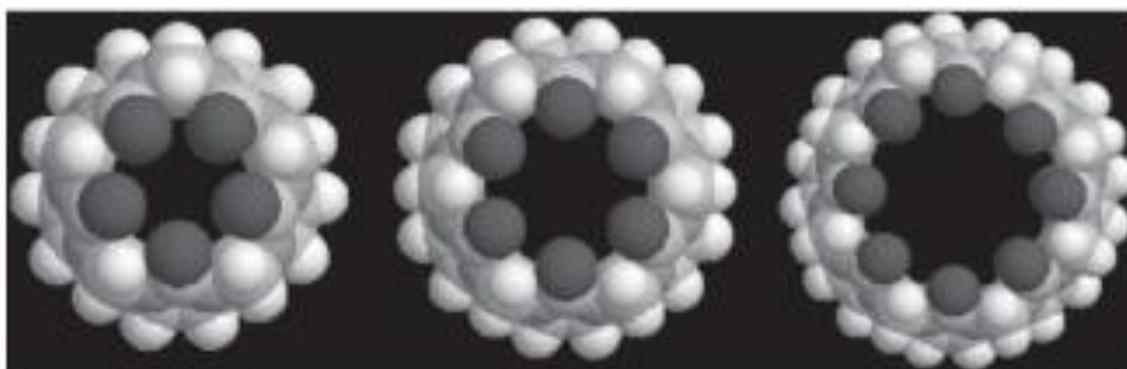


Figura 11. Ilustração das cucurbit[5]urila, cucurbit[6]urila e cucurbit[8]urila

Um fator que determina o uso das cucurbiturilas é o tamanho da cavidade do toroide empregado. Sendo assim, elas podem formar complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos químicos incluindo poliaminas, peptídeos e compostos heterocíclicos, sendo preferencialmente utilizadas em substâncias neutras (MOCK, 1996; FU et al., 2005).

3.8 CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS

As principais técnicas que auxiliam a comprovação dos prováveis processos de encapsulamento em dendrímeros ou cucurbiturilas, tanto no estado sólido quanto em meio líquido, são o diagrama de solubilidade de fases, análise térmica,

espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear, etc.

3.8.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho (EIV) trata-se de uma técnica que estuda a interação da radiação infravermelha com a matéria. A EIV tem sido amplamente utilizada para análise de vários compostos orgânicos ou inorgânicos, onde pode fornecer informações sobre os grupos funcionais da amostra, de acordo com sua natureza química. A identificação da amostra em questão dá-se pela absorção na região do infravermelho que é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas de uma molécula. Essa absorção de radiação infravermelha provoca, portanto, aumento da amplitude das vibrações moleculares. Uma técnica que complementa a interpretação destes fenômenos é a EIV por Transformada de Fourier (Em inglês, *FTIR*) (SILVERSTEIN et al., 2000; LOPES e FASCIO, 2004).

O espectrofotômetro registra os resultados na forma de bandas de absorção. Essas bandas contêm evidências de grupos funcionais na estrutura de uma molécula analisada. Isso ocorre porque os átomos interagem com a radiação eletromagnética levando ao processo de vibração atômica em torno das ligações covalentes (Silverstein *et al.*, 2000). Basicamente, há duas vibrações fundamentais: a vibração de estiramento e a vibração angular. No primeiro caso, a vibração de estiramento, também denominada de *stretching*, os átomos aumentam ou diminuem sua distância mantendo-se no mesmo eixo. No segundo caso, a vibração angular (*bending*), as posições dos átomos mudam em relação ao seu eixo de ligação original (SILVERSTEIN et al., 2000).

3.8.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Esta técnica mede a intensidade de raios-X difratados por uma amostra sólida em diferentes ângulos. Essa metodologia baseia-se na lei de Bragg que está relacionada ao espalhamento de ondas incidentes provocados por estruturas cristalinas. Essa detecção pode ser observada através de um filme fotográfico ou um

detector. As moléculas hospedeiras, geralmente apresentam picos de intensidade em vários ângulos diferentes, o que caracteriza estes compostos pela sua cristalinidade. A determinação dos complexos obtidos baseia-se na comparação dos perfis nos difratogramas entre as moléculas hospedeiras e os complexos contendo a β -lap (MENDONÇA et al., 2012).

3.8.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A ressonância magnética é um fenômeno que se relaciona com campos magnéticos e ondas eletromagnéticas com comprimentos de ondas de radiofrequência (RF). As informações obtidas pela RMN provem das propriedades magnéticas naturais dos átomos, em outras palavras spin nucleares. A base física deste fenômeno é didaticamente explicada com sendo dada pela existência dos tipos de movimentos circulares dos núcleos atômicos, mais especificamente o movimento giratório em torno de si mesmo ("spin"). Na presença de um campo magnético estático (B_0), os spins nucleares sofrem o movimento de precessão em torno do campo B_0 . Devido as suas vizinhanças químicas, cada spin nuclear apresenta uma frequência de precessão característica. Devido a abundância tanto no meio quanto em tecidos orgânicos, o hidrogênio (H) é bastante utilizado, seja em química analítica quanto na medicina (BEHROOZMAND et al., 2015).

A RMN é muito utilizada para determinação dos complexos obtidos. Essa técnica permite elucidar a estrutura do complexo e identificar as frações da molécula que podem estar interagindo com β -Lap.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes e solventes utilizados foram a β -lapachona (Cedido pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos – LTM), o polímero *B/S*-MPA POLIÉSTER-64-HIDROXIL HIPER RAMIFICADA - GERAÇÃO 4 (Sigma-Aldrich CAS 326794-48-3), o polímero Cucurbit[6]urila hidratada (Sigma-Aldrich CAS 80262-44-8), Etanol (CAS 64-17-5), Dimetil sulfóxido deuterado (Sigma-Aldrich CAS 2206-27-1), Acetonitrila (Sigma-Aldrich CAS 75-05-8), Ácido Acético glacial (Sigma-Aldrich CAS 64-19-7).

Para caracterização dos complexos obtidos foram utilizados: cromatógrafo sistema Shimadzu (Japão) equipado com duas bombas LC-6AD e um detector de UV-Vis SPD- 10A / 10AV; coluna LiChrospher 100, C18 de fase reversa com 4 mm x 12,5 cm, poros (5 μ m), espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível (UV/VIS), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) - Bruker, modelo IFS66 (Alemanha) em pastilhas de KBr e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C) realizados em aparelhos Varian UnityPlus 400 MHz (400 MHz para ¹H e 100 em dimetil sulfóxido deuterado, Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) em sistema TG – DTA simultâneos em analisador térmico da SHIMADZU modelo DTG - 60H, Calorímetro Exploratório Diferencial SHIMADZU, modelo DTA-50, difratômetro Siemens modelo D500, aparelho de ultrassom marca UNIQUE modelo USC-1600^a e microscópio eletrônico de varredura de modelo JSM – 5900 da marca Joel.

4.2 METODOLOGIA

4.1.2 COMPLEXOS COM O DENDRÍMERO (BLDD)

Para o complexo a ser formado com o dendrímero (BLDD) foram dissolvidos 300 mg da molécula da β -lapachona em aproximadamente 15mL de etanol em um balão de fundo redondo. Com a molécula hóspede completamente solúvel, foram adicionados 100mg do polímero hiper ramificado, e o sistema ficou sob agitação a

temperatura ambiente ao abrigo de luz. Adotaram-se três sistemas, baseados em testes preliminares, de agitação de acordo com os períodos de agitação; um dia, três dias e sete dias a fim de encontrar a melhor condição para a formação do complexo. Após cada período em agitação, o sobrenadante foi coletado e evaporado em rotaevaporador com temperatura abaixo de 40°C (HORCAJADA et al., 2006).

4.1.2 COMPLEXOS COM A CUCURBIT[6]URILA HIDRATADA (BLCD)

Para a obtenção do complexo formado com a cucurbit[6]urila hidratada foi estabelecida uma razão molar de 1:1 e 1:2 entre a molécula hospedeira e a hóspede. Foram pesados 100mg da cucurbiturila (0,1003 mM) e 24,3mg da β -lapachona (0,1002 mM) seguido de dissolução do fármaco. Utilizou-se aproximadamente 15mL de etanol, em balão de fundo redondo, sob agitação até completa dissolução da β -lapachona. Na sequência, a cucurbit[6]urila hidratada foi dissolvida em 15mL de etanol com o auxílio de aparelho de ultrassom. O sistema ficou sob agitação por 24hs e em seguida foi centrifugado para separar o precipitado, de cor branca, do sobrenadante. Após separar as fases, o sobrenadante foi coletado e armazenado enquanto o precipitado foi deixado secar a temperatura ambiente para posteriores caracterizações. Após cada período em agitação, o sobrenadante foi coletado e evaporado em rotaevaporador com temperatura abaixo de 40°C (VALERIA et al., 2015).

4.2 RESULTADOS DE DISCUSSÃO

4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO VIBRACIONAL NA REGIÃO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Foram realizadas análises de cada substância isolada e após serem submetidas ao processo de interação molecular objetivando a formação dos complexos. As moléculas foram caracterizadas por meio de seus modos vibracionais inerente a cada tipo de ligação química presente nas moléculas. A Figura 12 corresponde ao espectro de infravermelho da β -lapachona o qual apresenta uma

banda fortemente intensa e alargada em 3453 cm^{-1} , característica de deformação axial assimétrica e simétrica de O-H, não faz parte da estrutura química da β -lapachona. Essa ocorrência de vibração O-H é atribuída a moléculas água presentes na amostra, possivelmente de umidade, ou do KBr utilizado durante a sua análise.

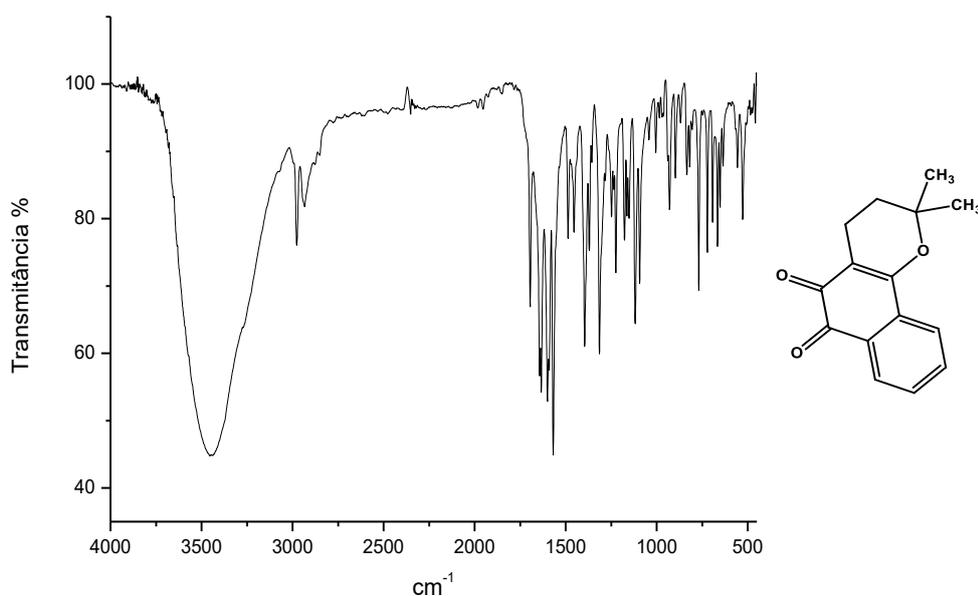


Figura 12. Espectro de absorção na região de infravermelho da β -lapachona.

A presença das bandas de absorção de média intensidade em 2978 e 2934 cm^{-1} são características das deformações axiais assimétricas e simétricas, respectivamente, da ligação C-H (onde esse carbono é sp^3) da metila. Próximo a essas vibrações é possível observar também as vibrações de C-H de metileno em frequência um pouco mais alta em torno de $2880 - 2840\text{ cm}^{-1}$. A região entre 2000 a 1800 cm^{-1} indica às bandas fracas de combinação e de harmônicas, características das estruturas aromáticas. As bandas em 1643 a 1568 cm^{-1} correspondem às vibrações C=C do anel aromático. A ocorrência de banda fortemente intensa na região de 1694 cm^{-1} refere-se à vibração do estiramento da carbonila. Já a ligação C-O-C apresenta bandas de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, nas regiões de 1115 e 1092 cm^{-1} . Os dados espectrais observados no espectro FTIR-MID são concordantes com os descritos na literatura (ALVES et al., 2008)

Já para o polímero hiper ramificado derivado do ácido metil-propanoico a ocorrência de banda de O-H é esperada (Figura 13), porém devido a sua

capacidade de fazer ligação de hidrogênio intramolecular e com moléculas de água, essa banda aparece entre $3480 - 3070 \text{ cm}^{-1}$ com baixa intensidade e sinal alargado (ZAGAR e GRDADOLNIK, 2003). Em 1735 cm^{-1} há um sinal característico de deformação axial de carbonila própria de função éster ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{R}$) e em 1477 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico da ligação $\text{C}-\text{O}$ (SILVERSTEIN et al., 2007).

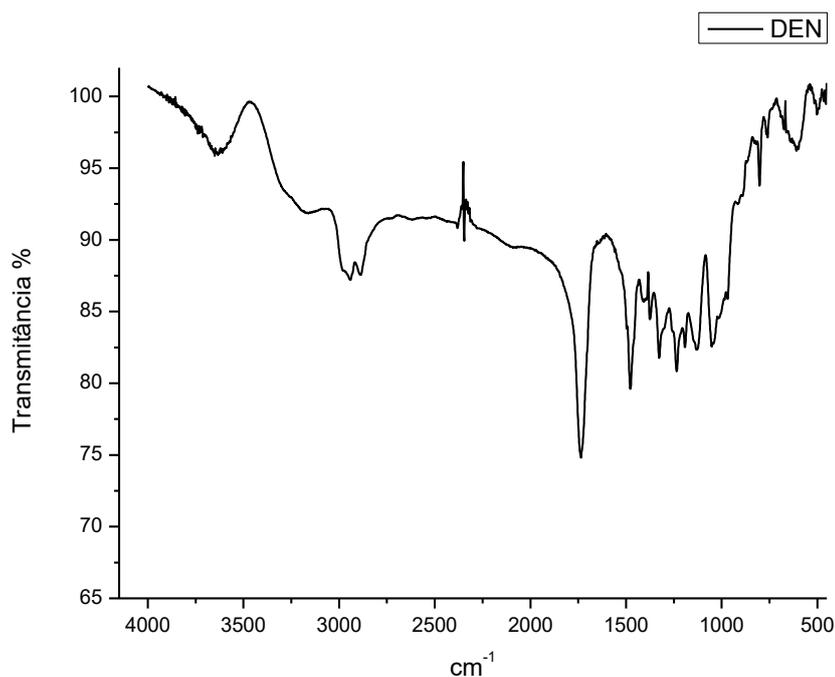


Figura 13. Espectro de absorção na região de infravermelho do dendrímero *bis*-MPA.

Para a macromolécula da cucurbit[6]urila a presença da banda de absorção em 3456 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ligação $\text{O}-\text{H}$, a qual é justificada pela presença de água de hidratação presente na estrutura da macromolécula (GERMAINA, et al., 1998). Em 2900 a 2890 cm^{-1} , há bandas de deformação axial características de $\text{C}-\text{H}$ (carbono sp^3). No entanto, as principais bandas que caracterizam os grupos funcionais da cucurbit[6]urila hidratada são as bandas $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}-\text{N}$ as quais aparecem com frequências de 1741 cm^{-1} e 1258 a 1234 cm^{-1} respectivamente, ambas apresentam sinais de alta intensidade (SILVERSTEIN et al., 2007). Segundo Mahajan et al. em 2010, o sinal de intensidade forte entre $890 - 820 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a um complexo modo de vibração de respiração e torção da estrutura macrocíclica anelar da cucurbiturila. Isto ocorre devido a repulsão existente

entre grupos N-CH-N e os -CH₂ e as tensões angulares provenientes das ligações do tipo sp³ (Figura 14) (MAHAJAN et al., 2010)

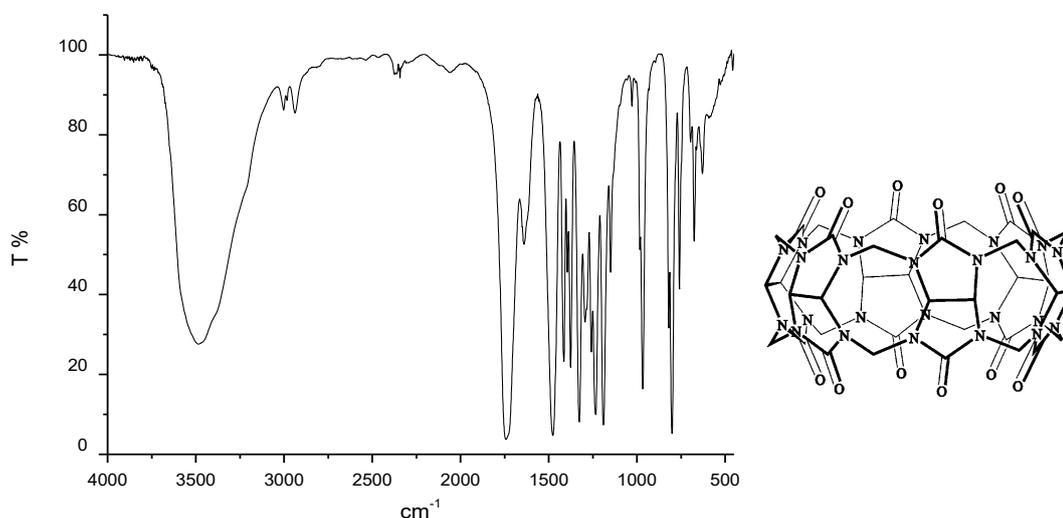


Figura 14. Espectro de absorção na região de infravermelho da cucurbit[6]urila hidratada.

Os resultados dos complexos originados das adsorções entre fármaco e carreador foram comparados com os reagentes percussores e com os complexos pretendidos em período de tempo diferentes (um, três e sete dias) afim de encontrar evidências significativas, ou não, que colaborem na caracterização dos complexos pretendidos.

De acordo com o espectro presente na Figura 15, para o sistema BLDD1, é possível observar de 3500 - 3100 cm⁻¹ o aumento da intensidade e largura da banda para as vibrações correspondente a ligação O-H dos grupos hidroxilas. No espectro do *bis*-MPA era possível detectar essa banda com baixa intensidade e largura devido as ligações de hidrogênio, inter e intramolecular, com as hidroxilas do polímero e até mesmo de moléculas água. Desta forma, com a proposição da formação do complexo, esta informação indica que “algo” está impedindo que estas interações ocorram como antes (ZAGARA, E., ZIGON, M., 2011). É possível que a β-lapachona esteja ocupando os espaços vazios que existem no interior da cavidade do dendrímero, causando um impedimento espacial que dificulta as interações de hidrogênios intramolecular anteriormente previstas (ZENG e ZIMMERMAN, 1997).

Outro aspecto importante é a diminuição da intensidade do sinal referente a carbonila do éster presente na estrutura do polímero, bem como na carbonila da cetona encontrada na β -lapachona. Demais deslocamentos e intensidades neste espectro não tiveram alterações significativas que caracterizassem a quebra de ligação (mudança nos grupos funcionais) ou formação de novo composto químico gerado a partir de ligações covalentes.

Os espectros de infravermelho para as amostras BLDD3 e BLDD7 não tiveram diferença dos resultados apresentados para o sistema BLDD1 (Figura 15).

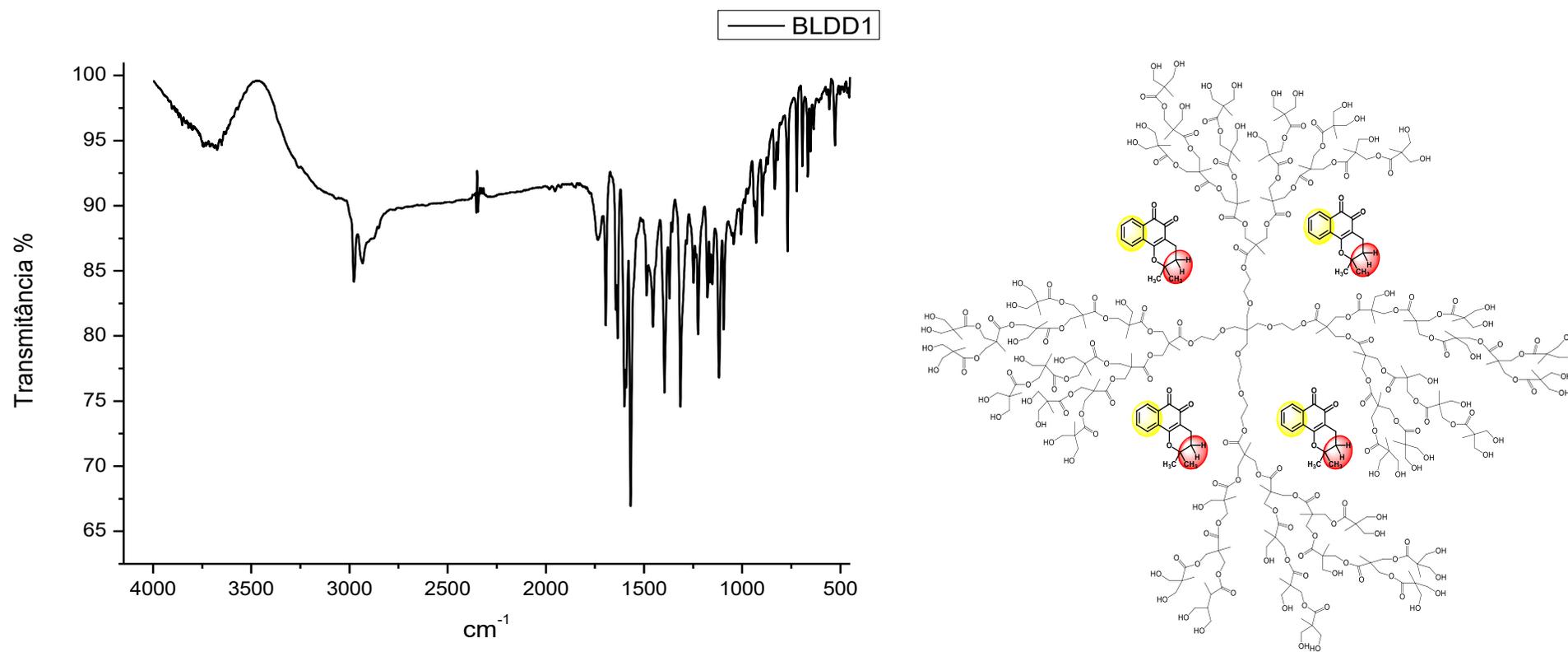


Figura 15. Espectro de absorção na região de infravermelho para o sistema BLDD1.

Os sistemas com a cucurbiturila foram analisados e o espectro referente ao experimento (Figura 16).

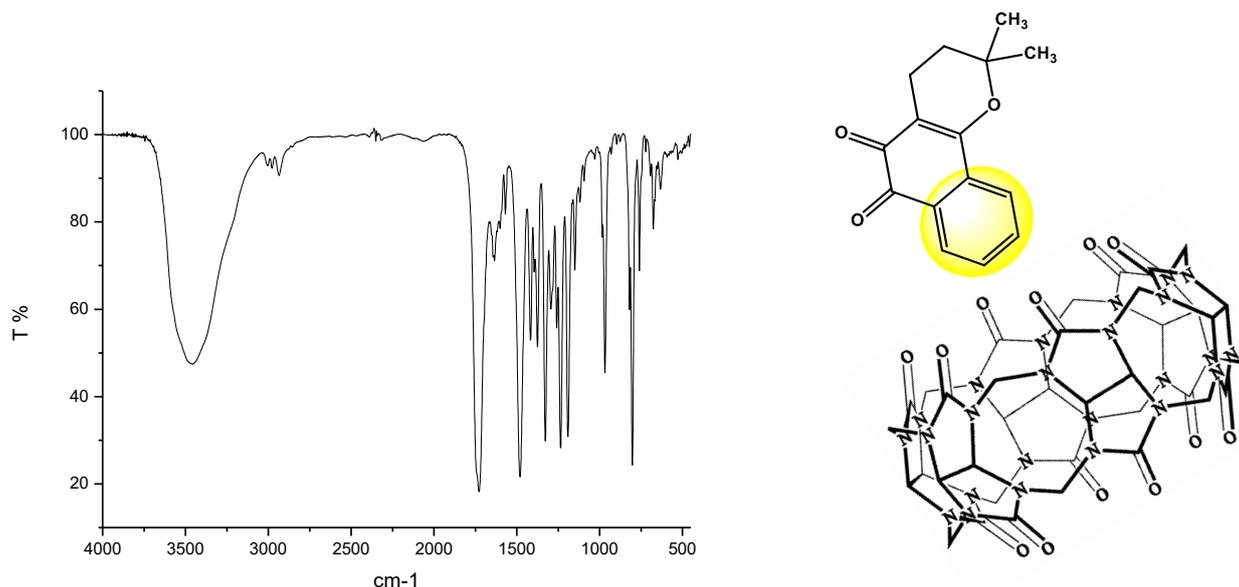


Figura 16. Espectro de absorção na região de infravermelho do sistema BLCD1

Ao investigar o espectro de infravermelho para o sistema BLCD1 é possível perceber uma diminuição na intensidade do sinal e no comprimento de onda, antes em 3456 cm^{-1} , atribuído a ligação O-H de moléculas de H_2O . Pode-se atribuir este evento à saída de moléculas de água da cavidade da cucurbiturila e com a possível entrada, parcial, da β -lapachona. Este fato torna-se interessante uma vez que as moléculas de água juntamente com a interação do solvente orgânica favorecem o processo de complexação entre o hospedeiro e o hóspede (BARROW, et al., 2015). Outro fato importante é a diminuição de intensidade e deslocamento das vibrações características de C-H em torno de 2975 cm^{-1} e a sobreposição das combinações e harmônicas características de C-H de aromático entre 2000 a 1800 cm^{-1} como mostrado na Figura 17. As outras bandas caracterizadas não sofreram alterações relevantes e nenhum novo sinal foi identificado, o que é uma resposta positiva quando se trata de interações não-covalentes.

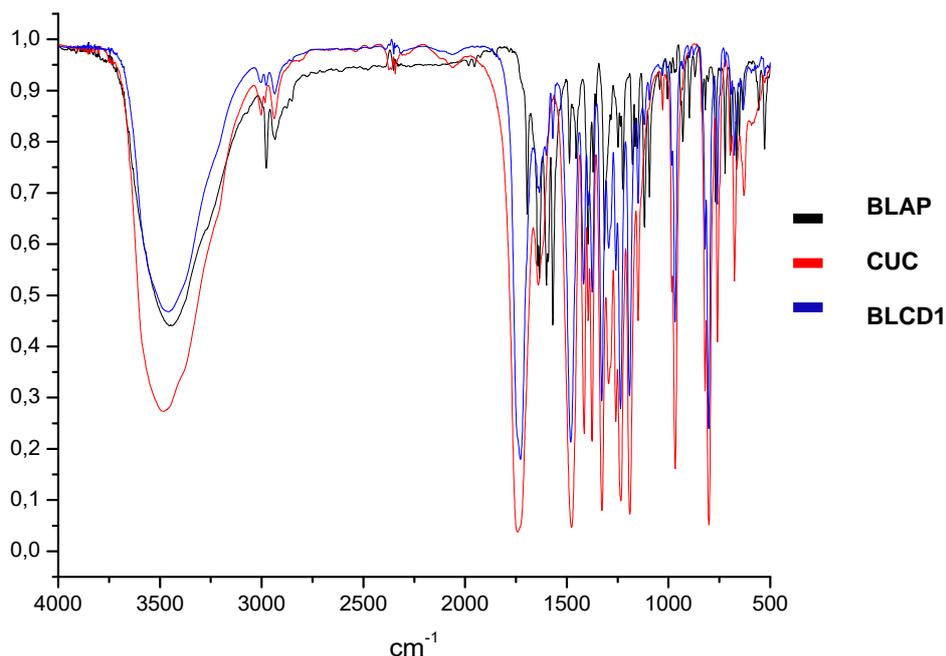


Figura 17. Espectro de absorção na região de infravermelho sobrepostos: BLAP; CUC e BLCD1

4.2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN ^1H)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) foram avaliados quanto as alterações nos deslocamentos químicos, intensidade e formato dos sinais. O espectro da β -lapachona, Figura 18, foi caracterizado e os resultados encontrados corroboram com os de Alves e colaboradores (2008).

Na análise do espectro de RMN ^1H da amostra BLAP foi observado um singlete em 1,41 ppm (H^1) correspondente aos seis hidrogênios de metila presente na estrutura. Os prótons dos dois grupos metilênicos do éster cíclico se apresentam na forma de tripleto em 1,81 (H^2) e 2,38 ppm (H^3), respectivamente. Já na porção do anel aromático, os prótons referentes são encontrados como dois dupletos em 7,90 ppm (H^4) (com maior desblindagem pela proximidade com a carbonila) e 7,75 ppm (H^5), e um multipletos para 2H em 7,61 (H^6) e 7,57 ppm (H^7) (Esquema 1) (ALVES et al., 2008)

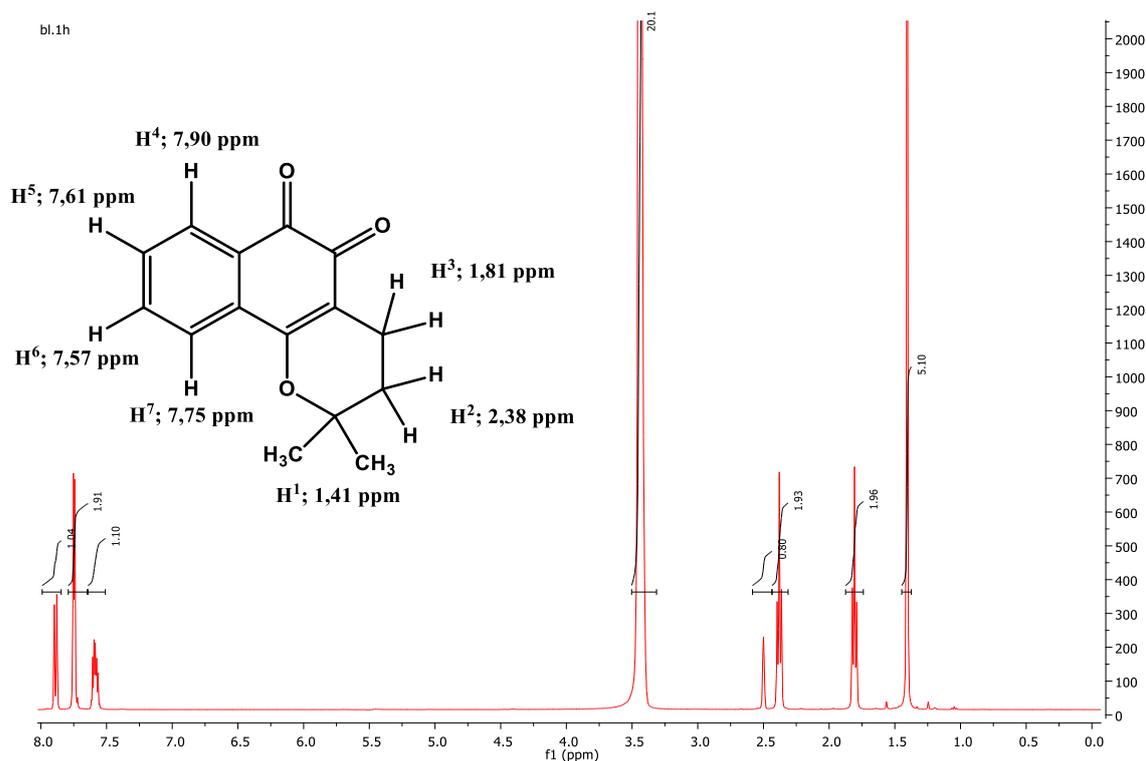


Figura 18. Espectro de RMN ^1H da β -lapachona em DMSO-d_6 .

O próximo espectro interpretado foi o do *bis*-MPA conforme apresentado na Figura 19. De acordo com os resultados encontrados, nota-se que o primeiro conjunto de sinais aparece com intensidades diferentes na região de 1,02 ($\text{H}^{\text{d}1}$) a 1,17 ppm ($\text{H}^{\text{d}2}$). Estes sinais foram atribuídos a grupos metilas $-\text{COO}-\text{C}-\text{CH}_3$ que estão ligados em diferentes partes da molécula do dendrímero. Sinais de $-\text{CCH}_2\text{O}-$ e $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ aparecem em uma frequência de ressonância de 3,41 a 3,49 ppm ($\text{H}^{\text{d}3}$ e $\text{H}^{\text{d}4}$) e estão situadas em regiões mais protegidas da molécula. Na faixa de 4,03 a 4,14 ppm ($\text{H}^{\text{d}5}$, $\text{H}^{\text{d}6}$ e $\text{H}^{\text{d}7}$) há sinais característicos da porção éster $-\text{CCH}_2-\text{OH}$, éster $-\text{CCH}_2-\text{éster}$, onde estes grupos éster estão espacialmente próximos destes hidrogênios, e éster $-\text{CCH}_2-\text{éster}$ espacialmente próximos de hidrogênios metílicos, respectivamente. Já na região de 4,35 ppm ($\text{H}^{\text{d}8}$) há um sinal com multiplicidade bem definida, um tripleto, proveniente do acoplamento entre dois grupos metilênicos vizinhos $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{éster}$ os quais estão situados próximos ao núcleo do dendrímero. Em seguida os sinais em 4,62 e 4,93 ppm ($\text{H}^{\text{d}10}$ e $\text{H}^{\text{d}9}$) foram relacionados com hidrogênios das hidroxilas situados espacialmente na porção mais interna do polímero e nas unidades terminais, respectivamente (Tabela 1) (ZAGAR e, ZIGON, 2002).

H ^{α1}	R ₂ —CH ₃	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>R₁</td> <td></td> </tr> <tr> <td>R₂</td> <td></td> </tr> <tr> <td>R_{2'}</td> <td></td> </tr> <tr> <td>R₃</td> <td>HO—OH</td> </tr> </tbody> </table>	R ₁		R ₂		R _{2'}		R ₃	HO—OH
R ₁										
R ₂										
R _{2'}										
R ₃	HO—OH									
H ^{α2}	R ₂ [*] —CH ₃									
H ^{α3}										
H ^{α4}										
H ^{α5}										
H ^{α6}										
H ^{α7} Próximo de H ^{α1}										
H ^{α8}										
H ^{β5}	Interno—OH									
H ^{α10}	Terminal—OH									

Tabela 1. Principais picos do *bis*-MPA.

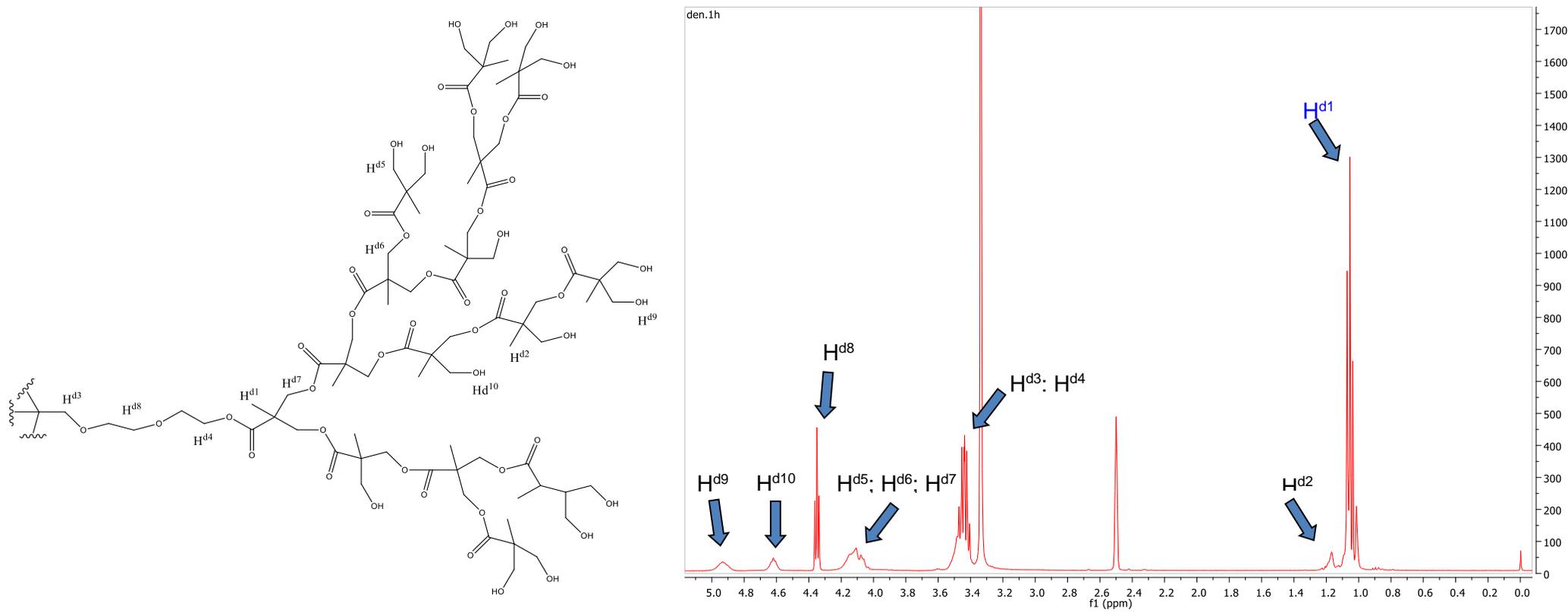


Figura 19. Espectro de RMN ^1H do dendrímero *bis*-MPA.

Os espectros dos complexos foram sobrepostos afim de visualizar alterações no formato dos sinais e seus deslocamentos químicos (Figura 20). Observa-se uma mudança no formato dos picos e a posição destes quando comparados com o fármaco livre. A incorporação da molécula hóspede nesta macromolécula se baseia em interações não covalentes, por exemplo, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogénio, interações π - π entre a molécula hóspede e o núcleo não polar do polímero (KURNIASIH et al., 2015). Os sinais referentes aos complexos BLDD 1,3 e 7 tiveram uma variação de 0,02 ppm quando comparados aos sinais da BLAP, o que pode ser considerado como indícios claros de interação do tipo hóspede-hospedeiro.

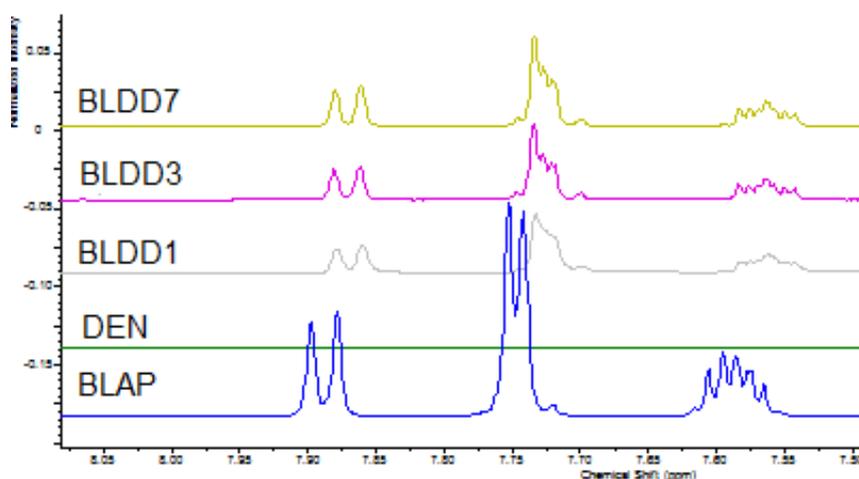


Figura 20. Ampliação dos sinais da região de aromático da β -lapachona livre e complexada.

Tabela 2. Deslocamentos químicos dos prótons de BLAP e suas variações quando no complexo BLDD1.

Hifrogênios H_{BLAP}	Deslocamentos δ (ppm)	Variações $\Delta\delta$ (ppm)
H ₁	1.41	-0,03
H ₂	2.38	-0,02
H ₃	1.81	-0,02
H ₄	7.90	-0,02
H ₅	7.61	-0,03
H ₆	7.56	-0,03
H ₇	7.75	-0,02

A alteração dos sinais do dendrímero também foram notadas como mostra a Figura 21. Os sinais alargados agora aparecem deslocados cerca de 0,03 ppm para campo baixo com relação ao dendrímero não carregado de β -lapachona.

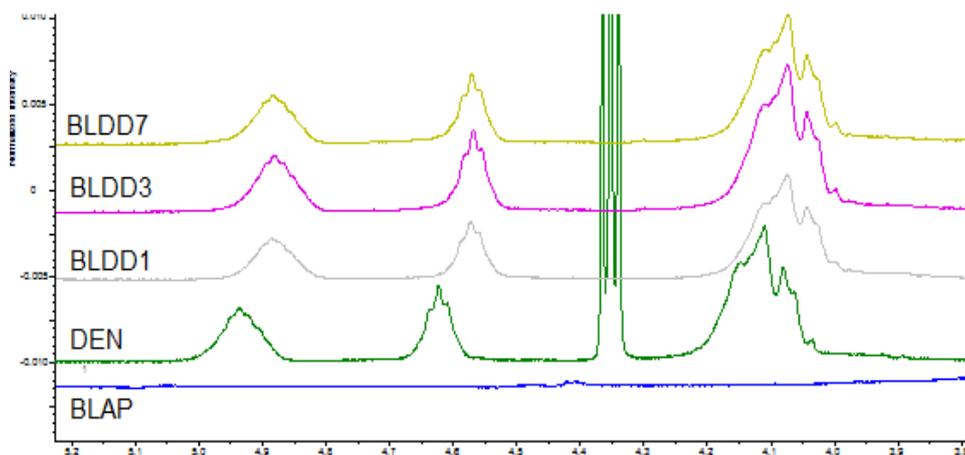


Figura 21. Ampliação dos sinais sobrepostos dos complexos BLDD's, DEN e da BLAP.

Tabela 3. Deslocamentos químicos dos prótons do DEN e suas variações quando no complexo BLDD1.

Hifrogênios H_{DEN}	Deslocamentos δ (ppm)	Variações $\Delta\delta$ (ppm)
H_{d1}	1,07 – 1,02	-0,04
H_{d2}	1,17	-0,04
H_{d3}	3,41 – 3,49	-0,02
H_{d4}	3,41 – 3,49	-0,02
H_{d5}	4,06 – 4,15	-0,04
H_{d6}	4,62 / 4,94	-0,05 / -0,06
H_{d7}	4,62 / 4,94	-0,05 / -0,06
H_{d8}	4,35	---
H_{d9}	4,62 / 4,94	-0,05
H_{d10}	4,62	-0,05

Para os complexos BLCD's apenas o espectro de RMN do complexo na proporção 1:1 foi evidenciado como indicado na Figura 22. Pode-se observar que os

sinais do provável complexo foram deslocados para campo alto com relação aos sinais da BLAP livre. Isso pode ocorrer, mais provavelmente, por dois mecanismos de interação, seja pela inclusão na cavidade hidrofóbica da CB[6] ou pela formação de uma rede supramolecular formada entre BLAP e CB[6]. Os sinais em 7,61 e 7,56 ppm (H^5 e H^6) sofreram uma variação de deslocamento químico de +0,02 ppm. Este efeito pode ser atribuído a proximidade dos prótons mencionados com as carbonilas que compõem os portais da CB[6].

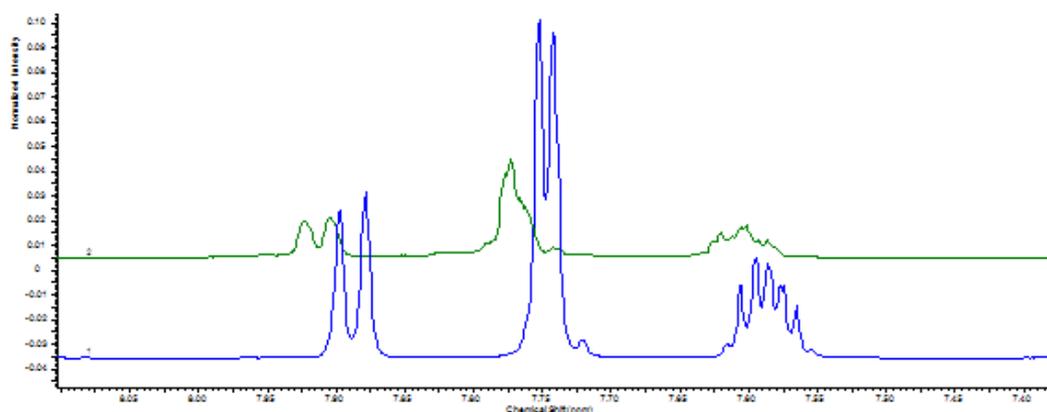


Figura 22. Ampliação dos sinais na região de aromático sobrepostos do complexo BLCD e da BLAP.

Baseado nas informações descritas pelas análises de RMN 1H é possível sugerir algumas possibilidades de interação existente nos complexos BLDD e BLCD. Estas inferências foram realizadas com base na variação dos deslocamentos químicos da β -lapachona, do DEN e da CUC. As Figuras 23 e 24 demonstram algumas das hipóteses para estas interações.

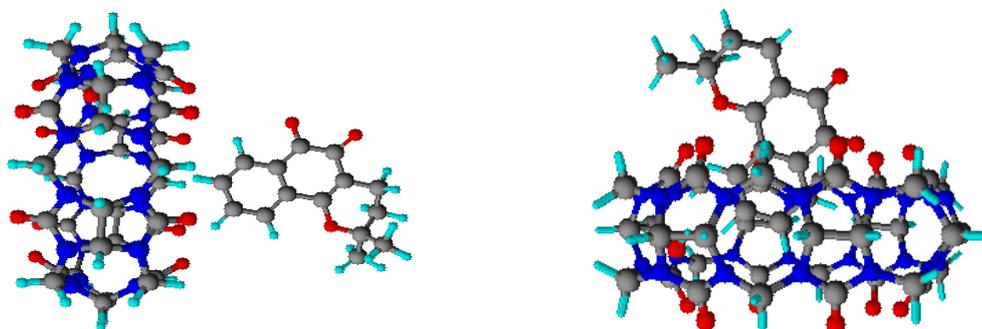


Figura 23. Possibilidades de interação para o complexo BLCD1 1:1

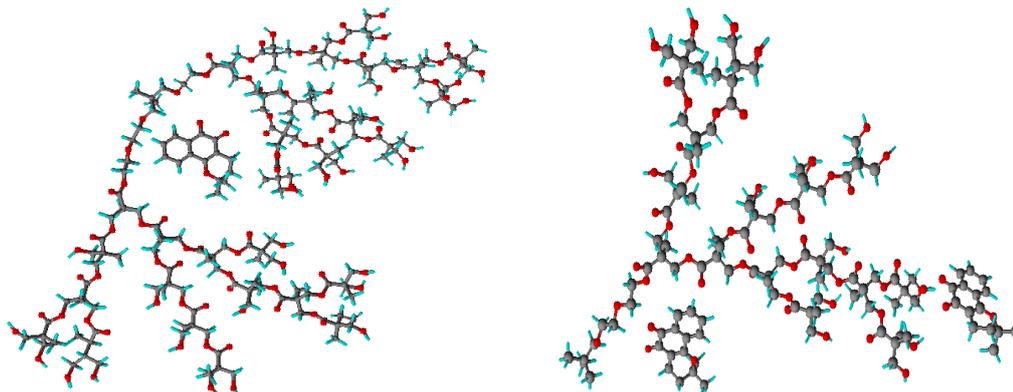


Figura 24. Possíveis mecanismos de interações para os complexos BLDD's.

4.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Foram realizadas análises de difração de raios-X de todas as amostras afim de compará-las com os complexos formados a partir das respectivas macromoléculas. O difratograma da β -lapachona apresenta vários picos de difração intensos e bem definidos, sendo o sinal principal em 9.5° (2θ), e alguns sinais secundários em 12.95 , 16.30 , 19.03 , 26.40 e 34.98° (2θ) os quais caracterizam a β -lapachona uma substância com alta cristalinidade (Figura 25) (CUNHA-FILHO, et al., 2007; NETO, et al., 2012).

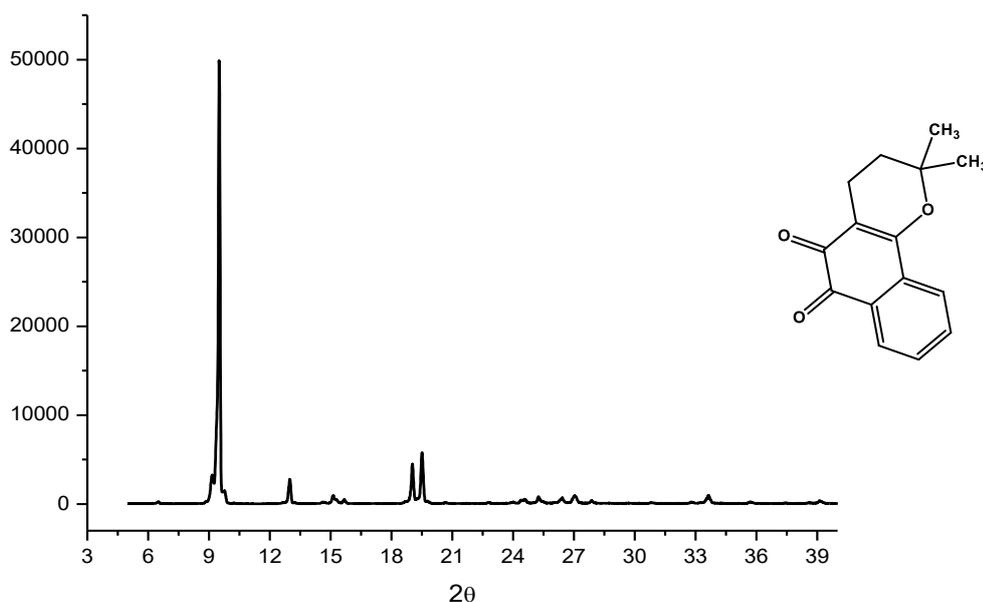


Figura 25. Difratograma de raios-X da β -lapachona.

Bem diferente do difratograma da β -lapachona, o dendrímero *bis*-MPA possui um perfil de difração característico de um material amorfo. É possível propor esta afirmação baseado no difratograma (Figura 26) deste polímero que mostra um halo enorme e baixa intensidade de sinal. Isto se dá porque grande parte dos dendrímeros possuem um arranjo molecular desordenado devido a sua condição de assumir várias conformações diferentes em solução, assemelhando-se a polímeros lineares amorfos (NICHOLSON, 2012)

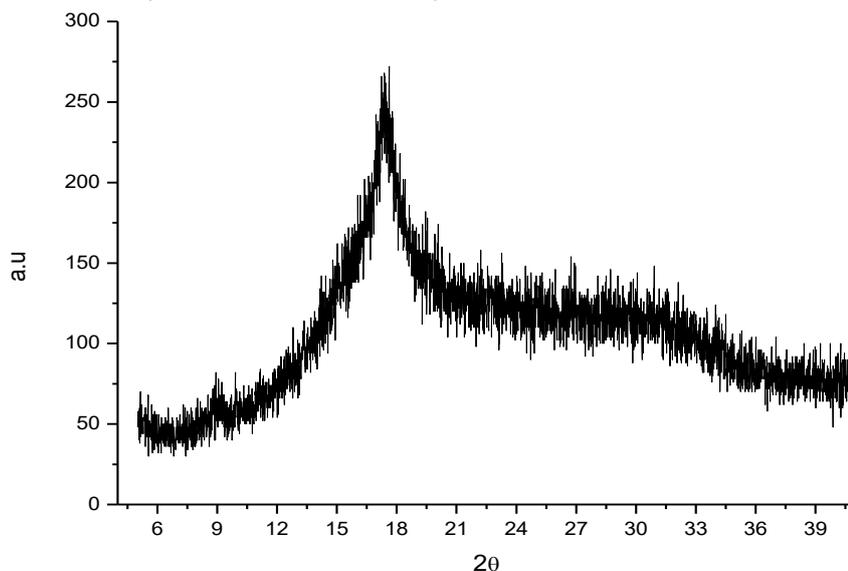


Figura 26. Difratograma de raio-X do dendrímero *bis*-MPA.

Já o difratograma de raio-X do complexo BLDD3 apresentou características, como intensidade dos sinais e largura dos picos, diferentes dos apresentados pela β -lapachona e dendrímero (Figura 27).

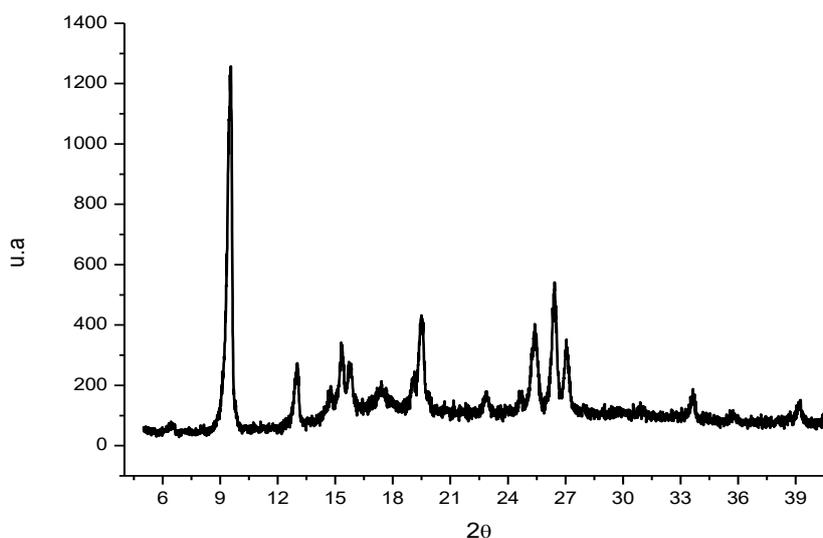


Figura 27. Difratograma de raio-X do complexo BLDD3.

A princípio não houve deslocamento do sinal principal da BLAP em 9.5° nem tão pouco dos picos secundários os quais juntos caracterizam a substância. Contudo, a diminuição da intensidade em todos os picos e a sobreposição dos padrões causados pelo dendrímero, quando comparado com o difratograma da BLAP sugerem a diminuição da cristalinidade do complexo BLDD3 obtido. A Figura 28 traz uma sobreposição dos difratogramas com o intuito de facilitar a visualização das observações anteriormente descritas.

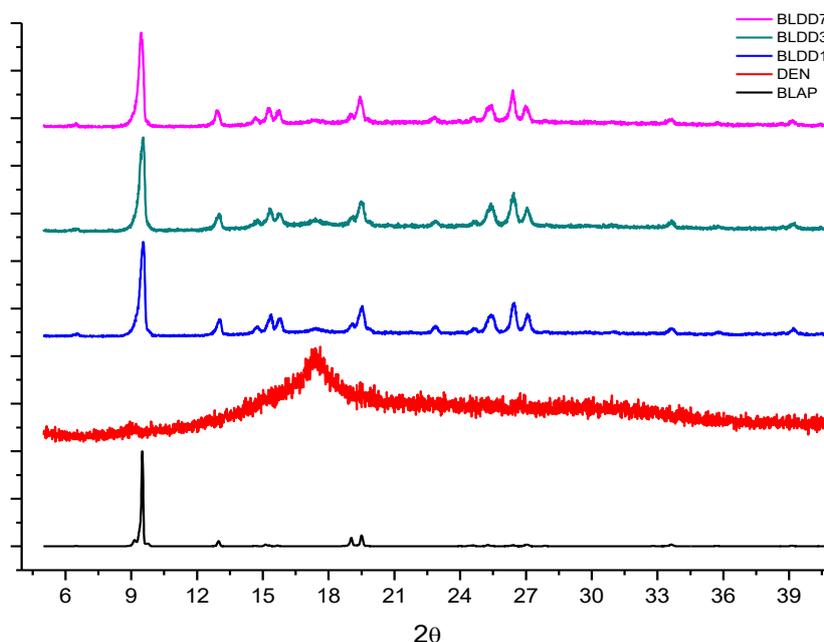


Figura 28. Difratogramas sobrepostos dos BLAP, DEN e BLDD's.

Assim como o dendrímero a cucurbiturila também teve seu difratograma coletado e apresentado como mostra a Figura 29. Observa-se que esta macromolécula apresenta características de um sólido amorfo, mas também algumas regiões com certa cristalinidade. Em 14.5° , 15.6° e 23.9° , há padrões de difração de raios-X que caracterizam os principais picos da cucurbit[6]urila (LIM et al., 2008).

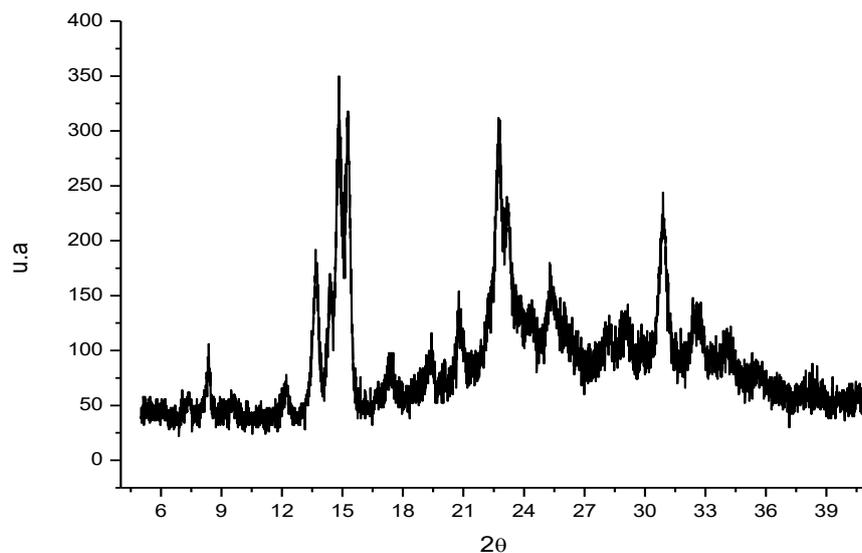


Figura 29. Difratoograma de raio-X da cucurbit[6]urila.

Os complexos BLCD1 1:1 e o BLCD1 1:2 foram mostrados conforme consta na Figura 30. Nestes difratogramas é possível observar um alargamento dos sinais da CUC e uma sobreposição dos sinais de BLAP indicando a formação de compostos com menor cristalinidade do que seus percussores livres. Tais resultados corroboram com os encontrados por Zhang et al em 2011 quando eles sugerem a formação de um complexo de inclusão usando a cucurbit[6]urila e etileno.

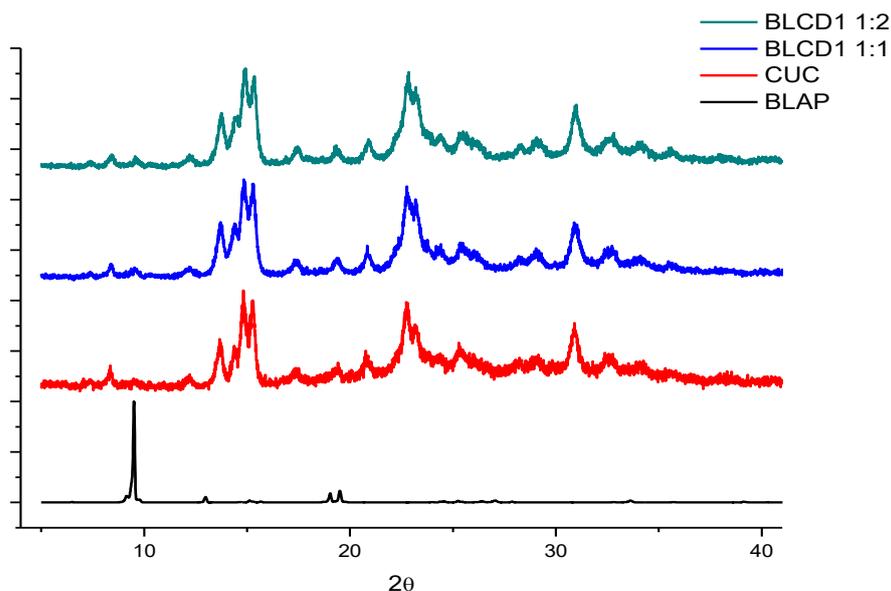


Figura 30. Difratoogramas da BLAP, CUC, BLCD1 1:1 e 1:2.

4.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises realizadas no microscópio eletrônico de varredura revelaram aspectos morfológicos dos materiais estudados. Todas as substâncias foram analisadas individualmente e com ampliações das imagens próximas visando um melhor referencial no momento de comparação das imagens. A BLAP como mostra a Figura 31, apresenta um formato acicular dos seus cristais e um tamanho micrométrico regular (ALVES et al., 2008; NETO et al., 2012).

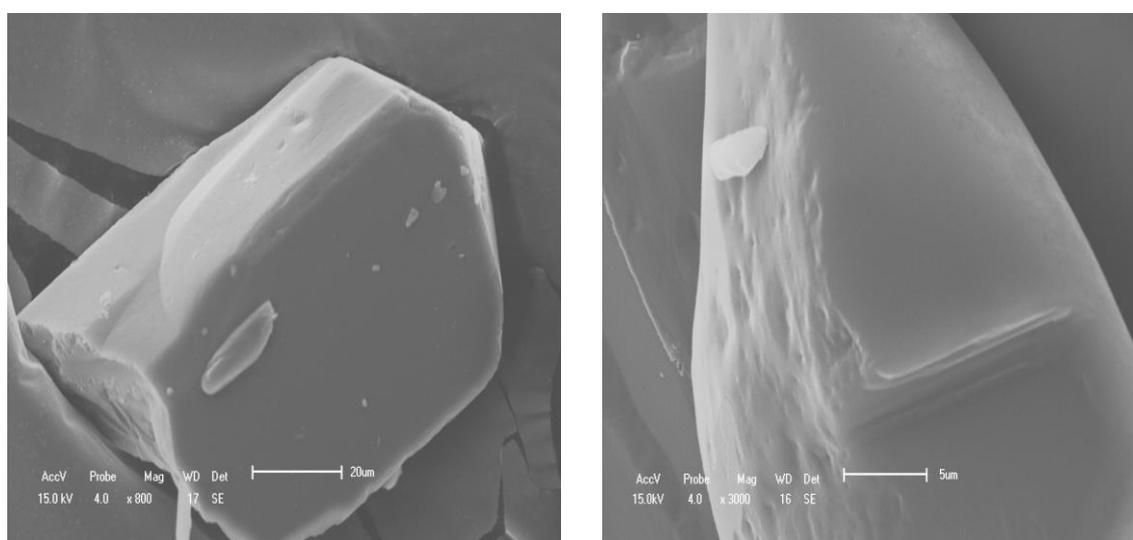


Figura 31. Imagem da BLAP nas ampliações de 800x e 3000x

A microscopia realizada para o dendrímero mostrou um material com um aspecto poroso e sem uma regularidade quanto ao seu formato. Estas informações condizem com os resultados encontrados no DRX para este material, como mostra a Figura 32.

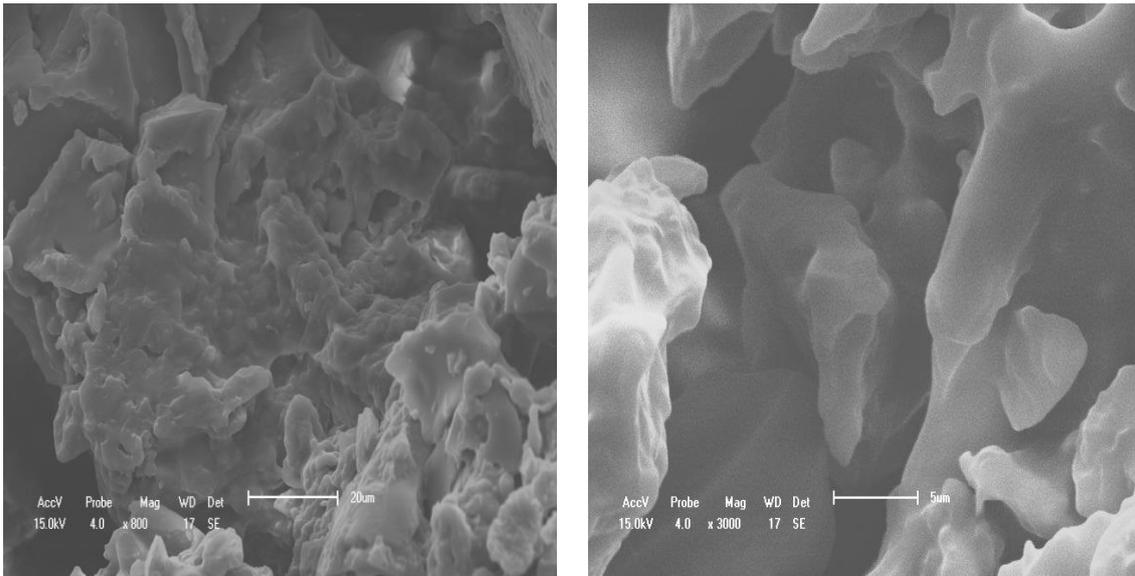


Figura 32. Imagens do *bis*-MPA nas magnificações de 800x e 3000.

Na Figura 33 encontra-se as imagens capturadas para o complexo BLDD1. É possível observar que os cristais da BLAP, antes regulares e com uma forma acicular bem definida, agora mostram-se menores, espalhados sobre a superfície do dendrímero e com um formato diferente.

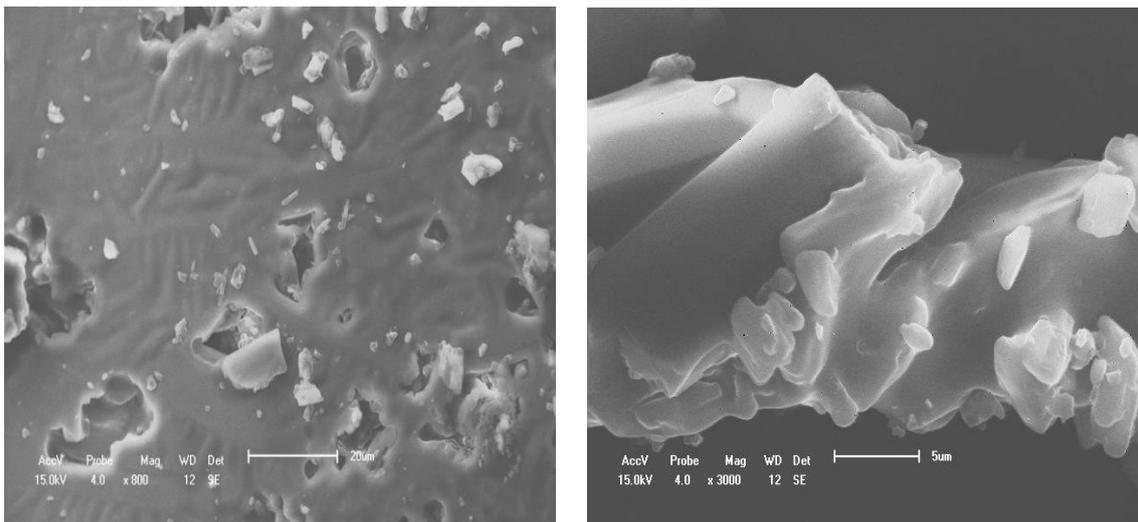


Figura 33. Imagens do BLDD1 nas magnificações de 800x e 3000x

A Figura 34 contém imagens da microscopia da CUC em magnificações diferentes.

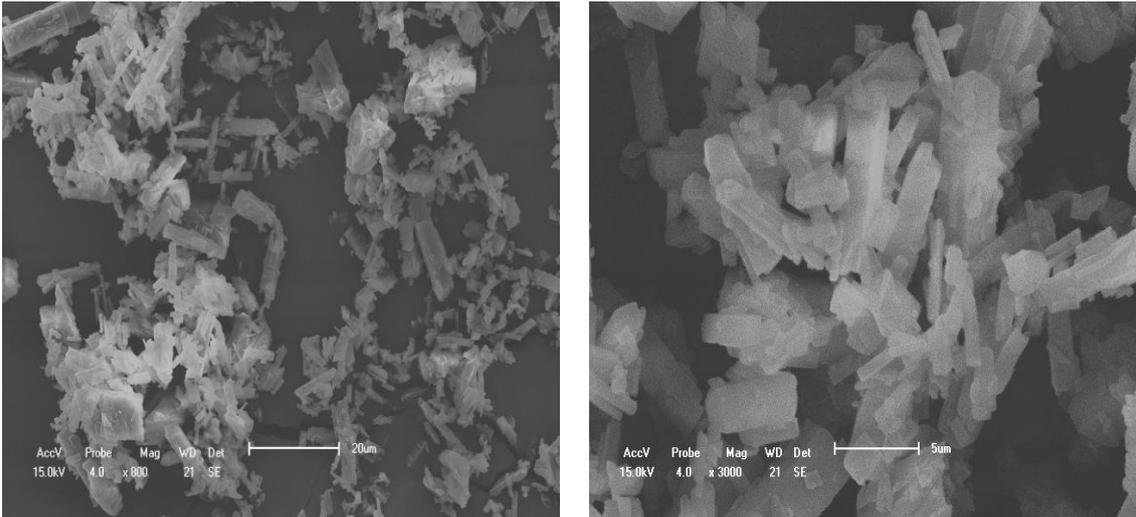


Figura 34. Imagens da CUC nas magnificações de 800x e 3000x.

Analisando as imagens da CUC é possível relacioná-las com os resultados de DRX que apontam uma certa cristalinidade para esta substância. A Figura 35 apresenta os resultados da microscopia realizada para os complexos BLCD1's.

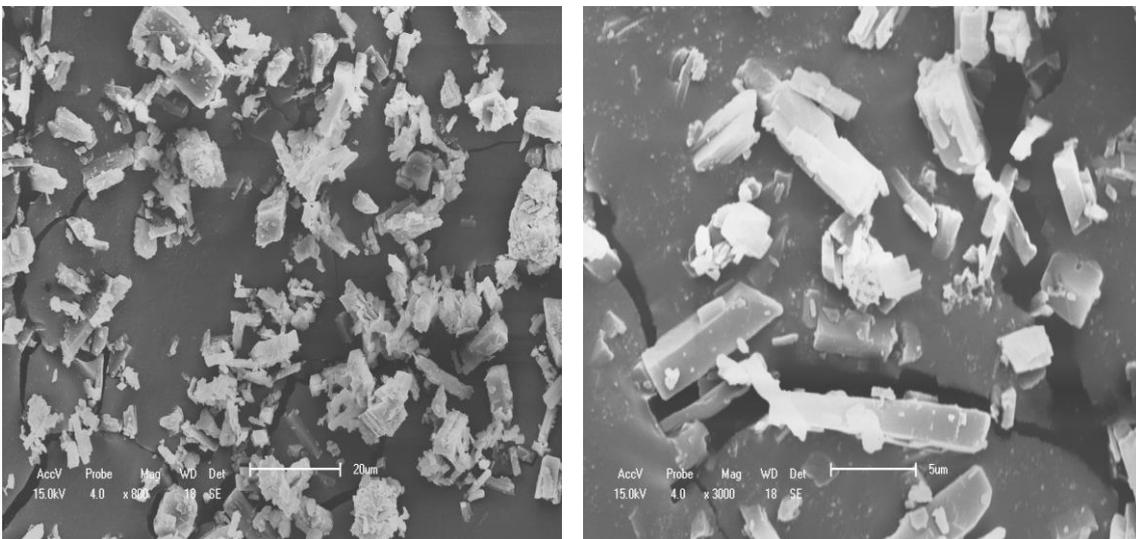


Figura 35. Imagens do complexo BLCD1 1:1 nas magnificações de 800x e 3000x.

4.2.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (ATG)

As análises das curvas TG foram feitas com razão de aquecimento de 10 °C/min. O termograma da β -lapachona foi interpretado de acordo com dados apresentados na Figura 37. A curva termogravimétrica da BLAP indica que a forma cristalina desta substância foi termicamente estável até 187,0 °C e o processo de decomposição térmica ocorreu em único evento e demonstra uma perda percentual de massa de 69,64%. Em seguida, ocorreu um processo de decomposição iniciado a 181,72 °C e finalizado em 251,23 °C, confirmado pelos dados do DSC. A faixa de fusão da droga também foi confirmada pelo TG-fotovisual nas temperaturas de 158,03 a 160,77 °C, conforme Figura 36, estando de acordo com relatos na literatura (ALVES, et al., 2008; CUNHA-FILHO, et al., 2007).



Figura 36. DSC fotovisual: momento exato do processo de fusão da BLAP

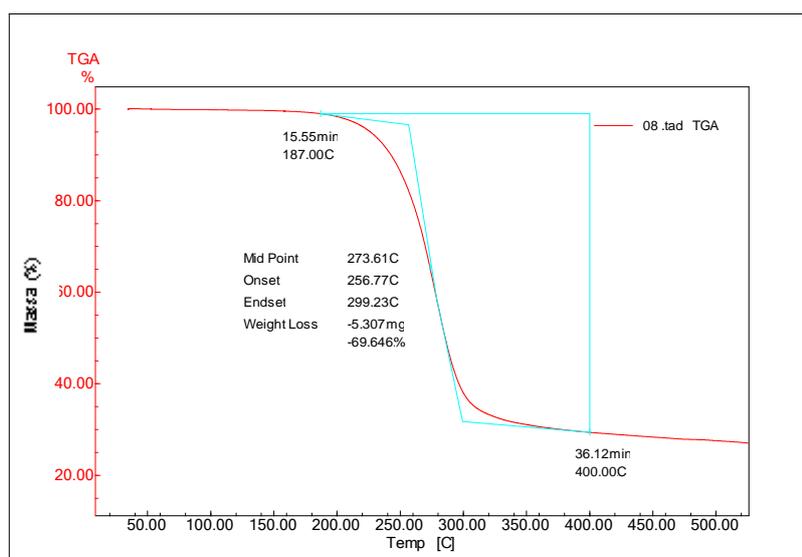


Figura 37. Termograma da BLAP

O polímero *bis*-MPA foi analisado via TG e seu gráfico térmico encontra-se na Figura 38. O composto DEN demonstrou ter boa estabilidade térmica e apresentou dois eventos de decomposição térmica. O primeiro evento começou em 24,2 °C e foi até 64,5 °C com uma perda de massa de 5,12% atribuída a perda de moléculas de água. O segundo evento é caracterizado por uma perda de massa de 94,88%, que teve início em 290,80 a 416,34 °C que está atribuído a decomposição e sublimação do dendrímero.

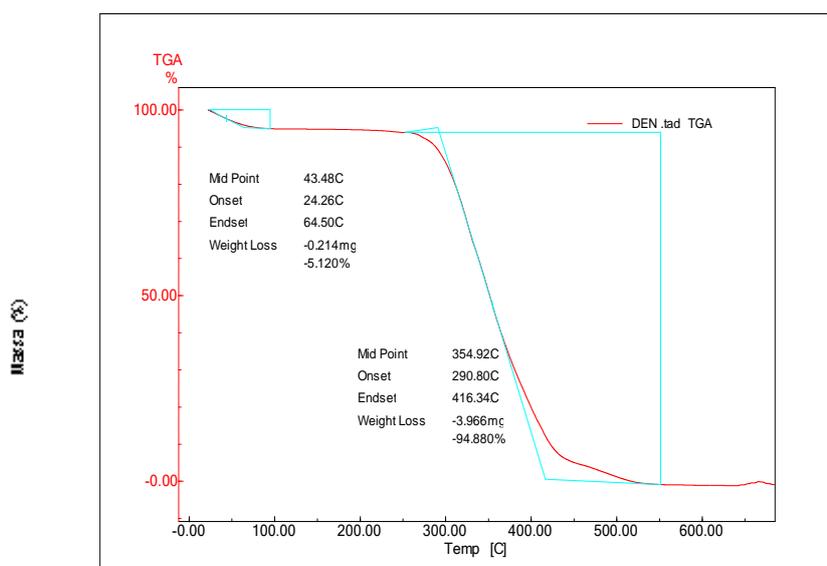


Figura 38. Termograma do polímero hiper-ramificado *bis*-MPA.

Para a CUC também foi realizado a análise de TG como mostra a Figura 39. É possível observar que no termograma da cucurbiturila ocorreram dois eventos térmicos relacionados a perda de água e decomposição da macromolécula. A perda de água de 9,97% tem início em 31,43 °C e termina 110,6 °C e está relacionada a moléculas de água que estão no interior da CUC. Em seguida é possível verificar uma diminuição na massa de 70,17% que corresponde a decomposição da cucurbiturila.

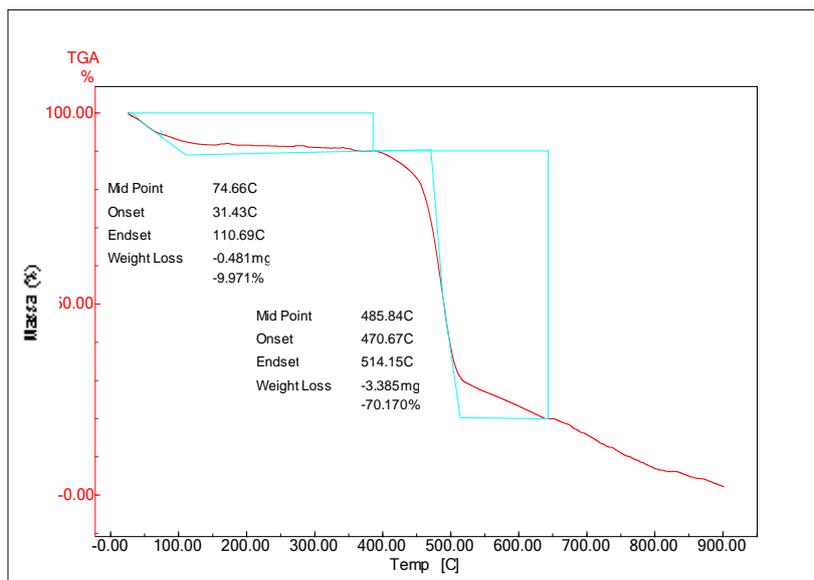


Figura 39. Termograma da cucurbit[6]urila.

Os termogramas dos complexos BLDD's foram sobrepostos a fim de confrontá-los com os dados de BLAP e DEN como mostra a Figura 40. Os resultados dos termogramas dos complexos sugerem uma redução do evento térmico associado a liberação de moléculas de água que pode estar relacionado a presença da β -lapachona nos sítios antes ocupados por essas moléculas de água. Além disso é possível notar um aumento na estabilidade térmica associada aos complexos quando comparadas a BLAP livre. Um terceiro evento, discreto, aparece em torno de 500 °C a 800 °C que pode ser atribuído a decomposição do fármaco que está complexado com o polímero.

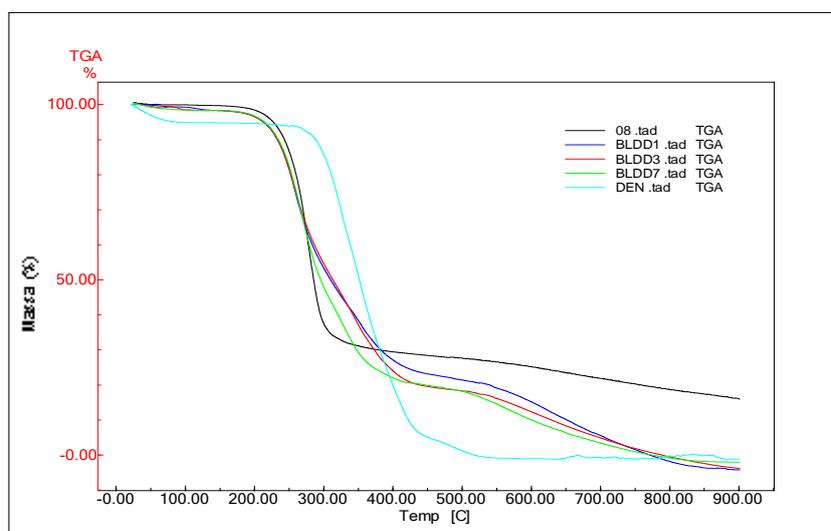


Figura 40. Sobreposição das análises termogravimétricas de BLAP, DEN e dos complexos BLDD1, 3 e 7.

Para os complexos BLCD's os termogramas dos complexos mostraram características diferentes para os complexos nas razões molares de 1:1 e 1:2. Para ambos os casos se observa uma perda de água, de 7,49%, semelhante com os dados apresentados pela CUC, com a diferença que o complexo BLCD 1:2 apresentou menor desprendimento de moléculas de água. Isso pode estar relacionado com o excesso de moléculas do fármaco que dificultam a saída destas moléculas. Este fato pode ser importante quando é considerado que o excesso de fármaco pode favorecer a formação de uma estrutura supramolecular além dos complexos de inclusão. Para o complexo BLCD 1:1 a curva termogravimétrica apresenta um perfil semelhante à da cucurbiturila livre que pode sugerir a complexação do fármaco na cavidade do macrocíclo (Figura 41).

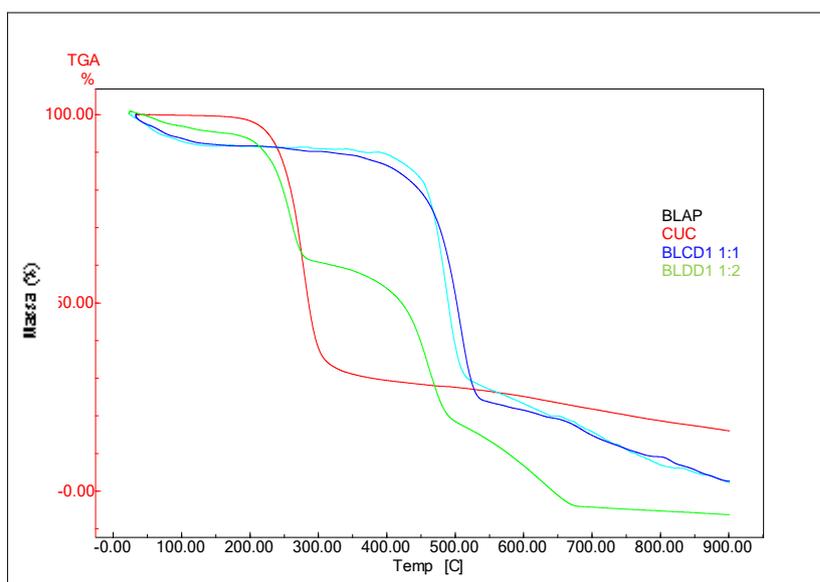


Figura 41. Sobreposição das análises termogravimétricas de BLAP, CUC e dos complexos BLCD 1:1 e 1:2.

4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para todas as análises de DSC foi empregada uma razão de aquecimento de 10 °C/min. Na curva DSC da BLAP observa-se um pico endotérmico característico do processo de fusão do fármaco, numa faixa de 158,03 a 160,77 °C, com temperatura final de 164,62 °C e elevada energia envolvida no processo $\Delta H = 80.23 \text{ J.g}^{-1}$ (Figura 42). Na sequência nota-se um pico endotérmico em 251, 23 °C que

possui uma alta energia envolvida ($\Delta H = 212,57 \text{ J.g}^{-1}$) que está relacionado, possivelmente, a degradação da β -lapachona.

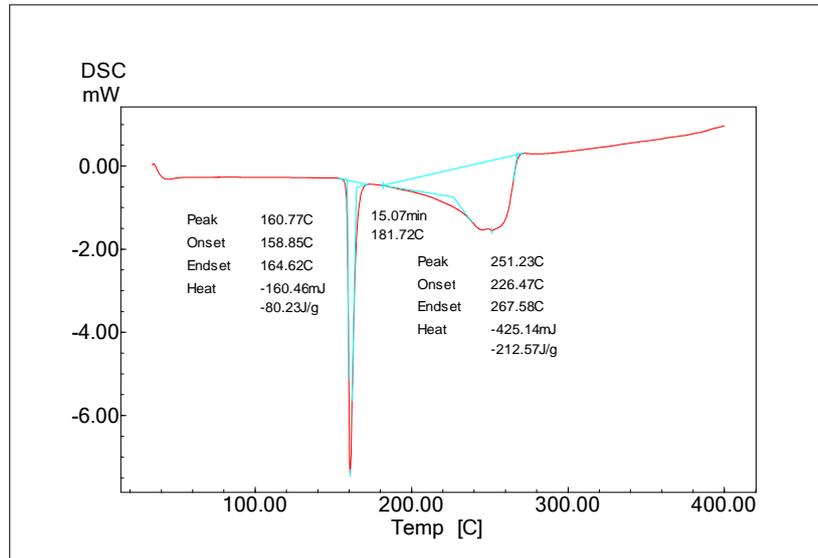


Figura 42. Curva DSC da BLAP.

A curva de DSC para o polímero hiper ramificado, Figura 43, mostra um perfil característico de um material amorfo como mostrado também no resultado de DRX. Há um pico endotérmico alargado em $94,19 \text{ }^\circ\text{C}$ que está relacionado a energia absorvida para a evaporação da água e a diminuição das ligações de hidrogênio intramolecular formada entre as hidroxilas do dendrímero ($\Delta H = 52,51 \text{ J.g}^{-1}$) (ZAGAR, et al., 2005).

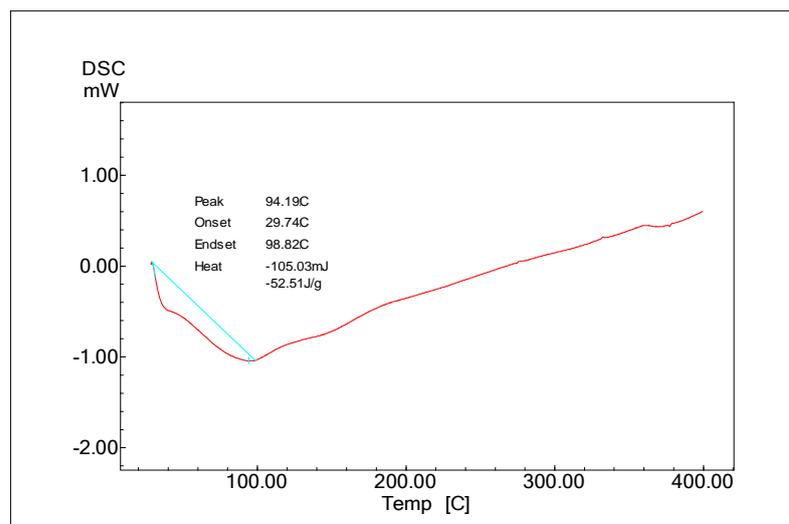


Figura 43. Curva DSC do polímero *bis*-MPA.

A análise calorimétrica da cucurbiturila foi apresentada na Figura 44. O primeiro pico largo de característica endotérmica mostra uma absorção de energia de 201,34 J.g⁻¹ na faixa de 33,89 a 115,01 °C que estão relacionados com as moléculas de água de alta energia que absorvem calor para deixar a cavidade da CUC. O próximo evento está relacionado ao processo de decomposição do macrociclo onde a energia é absorvida na faixa de 294,61 a 366,16 °C com uma entalpia de 170,26 J.g⁻¹.

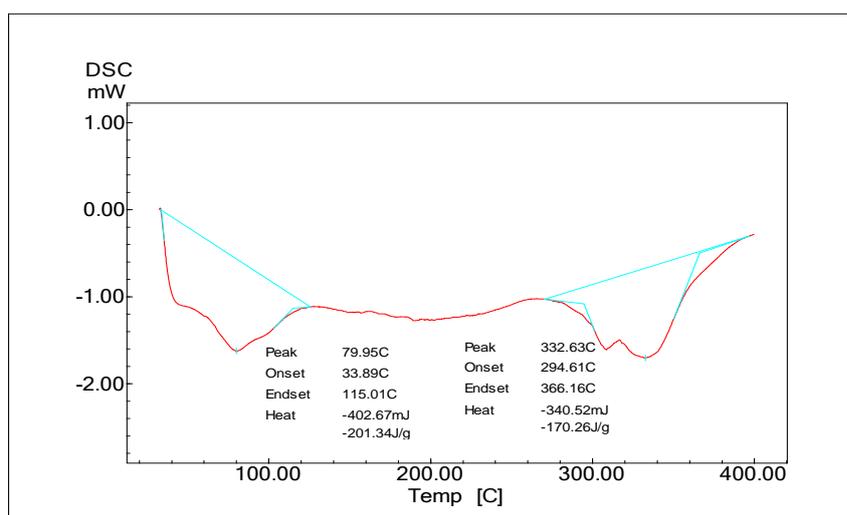


Figura 44. Curva DSC da cucurbit[6]urila.

Nos DSC dos complexos BLDD's é possível perceber um deslocamento e alargamento do pico referente a fusão do fármaco. Antes esse pico aparecia em 160,77 °C com uma absorção de energia de 80,23 J.g⁻¹, agora aparece em 157,08

°C com uma energia de $50,54 \text{ J.g}^{-1}$. Esta diminuição pode estar atrelada a redução da cristalinidade, corroborando com os dados do DXR, do fármaco quando complexado com o dendrímero. A liberação de energia envolvida no processo de degradação da BLAP também teve alterações que podem ser atribuídas ao processo de complexação do fármaco no polímero (Figura 45).

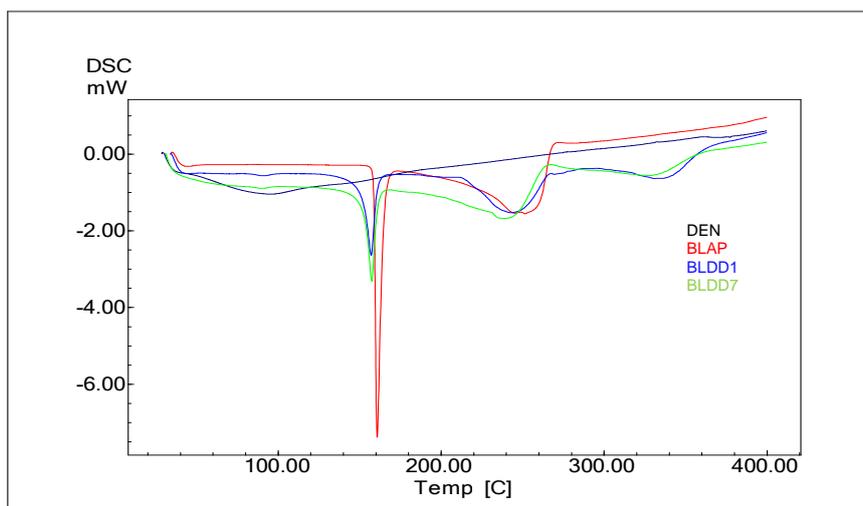


Figura 45. Curvas de DSC dos complexos BLDD's, BLAP e DEN.

Os complexos sugeridos entre o fármaco e a cucurbiturila foram sobrepostos conforme indicado na Figura 46. Os resultados de DSC para os BLCD's mostram o desaparecimento do pico correspondente a fusão do fármaco e conservam as características do carreador. Em concordância com os dados mostrados no DRX, os sinais característicos da β -lapachona foram sobrepostos pelos da cucurbiturila o que sugere a interação entre BLAP e CUC.

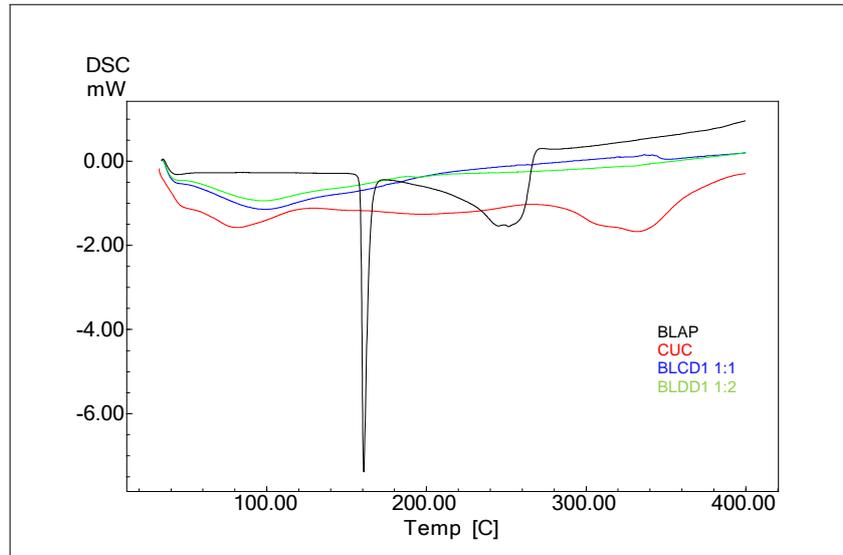


Figura 46. DSC dos complexos BLCD's, BLAP e CUC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONCLUSÕES

Durante a elaboração deste trabalho foi proposto a formação de complexos entre a β -lapachona e duas macromoléculas completamente distintas, o polímero hiper ramificado bis-MPA e a Cucurbit[6]urila hidratada. De início pode-se inferir que o principal objetivo do trabalho foi alcançado uma vez que conseguiu-se demonstrar a interação da droga com os carreadores.

As substâncias BLAP, DEN e CUC e seus respectivos complexos, BLDD's e BLCD's, foram caracterizados pelas técnicas de FTIR, RMN ^1H , DRX, MEV, TG e DSC. Os resultados obtidos a partir destas análises foram essenciais para que propuséssemos um possível mecanismo de interação do fármaco com os carreadores estudados.

Os resultados do FTIR associado com o RMN ^1H sugeriram que os complexos BLDD's tiveram seu sítio de interação associado a parte interna do dendrímero onde há regiões hidrofóbicas gerada pelas interações intramoleculares dessa macromolécula. A medida que o processo de complexação ocorre, estas regiões hidrofóbicas passam a ser ocupadas por moléculas da β -lapachona. O que também foi observado para os complexos BLCD's, que tiveram determinadas alterações sugeridas pela entrada parcial da porção aromática da β -lapachona ou através da formação de uma estrutura supramolecular entre fármaco e moléculas da cucurbiturila.

As análises de DRX, MEV, TG e DSC, revelaram aspectos importantes que reforçam a nossa sugestão de interação dos complexos BLDD's e BLCD's. Os complexos BLDD's demonstraram um padrão de difração bastante interessante que podem evidenciar uma diminuição nos tamanhos dos cristais da β -lapachona livre. Estas observações foram mais sugestivas quando as imagens da microscopia eletrônica e os dados das análises térmicas foram associados ao DRX. Já os complexos BLCD's sugerem a formação de uma estrutura bastante semelhante à da CUC com uma sobreposição dos padrões de difração da BLAP livre. O MEV e as análises térmicas sugerem a ideia de formação de um complexo com propriedades semelhantes à do carreador, o que é um bom sinal quando supomos, em uma das hipóteses, a interação pela formação de um complexo de inclusão.

Portanto este trabalho sugere que é possível a formação de complexos do tipo hospedeiro-hóspede entre os carreadores e o fármaco estudado. Esta interação

é bastante útil para propor, por exemplo, sistemas de liberação controlada do fármaco. Ainda foi possível verificar aspectos físico-químicos dos complexos que podem contribuir com a melhoria da solubilidade da β -lapachona em meio aquoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

AIRES, A.L., XIMENES, E.C.P.A., SILVA, R.A.R., BARBOSA, V.X., GÓES, A.J.S., PEIXOTO C.A., SOUZA, V.M.O., ALBUQUERQUE, M.C.P.A. Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Experimental Parasitology* 142 (2014) 83–90.

ALMEIDA, E. R.; SILVA-FILHO, A. A. A.; SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. J. Antiinflammatory action of lapachol. *Ethnopharmacol.* 1990, 29, 239-41.

ARAUJO, D.R., TSUNEDA, S.S., CEREDA, C.M.S., CARVALHO, F.D.G.F., PRETÉ, P.S.C., FERNANDES, S.A., YOKAICHIYA, F., FRANCO, M.K.K.D., MAZZARO, I., FRACETO, L.F., BRAGA, A.F.A., PAULA, E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2- hydroxypropyl-b-cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* , 2008, 33, 60–71.

ARAÚJO, M.V.G., VIEIRA, E.K.B., LÁZARO, G.S., CONEGERO, L.S., ALMEIDA, L.E., BARRETO, L.S., COSTA, N.B., GIMENEZ, I.F. Sulfadiazine/hydroxypropyl-b-cyclodextrin host–guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 5788–5794.

ASCHE, C. Antitumour quinones. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2005, 5, 449-467.

BARBOSA, T. P.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; MARTINS, R. M.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from norlapachol with molluscicidal activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 6464-6469.

BEHROOZMAND, A.; KEATING, K.; AUKEN, E. A Review of the Principles and Applications of the NMR Technique for Near-Surface Characterization. **Surveys in Geophysics**, v. 36, n. 1, p. 27-85, 2015/01/01 2015. ISSN 0169-3298.

BOSMAN, A. W.; JANSSEN M. AND MEIJER E. W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Laboratory of Macromolecular and Organic*

Chemistry, Eindhoven University of Technology, P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven, The Netherlands. *Chem. Rev.*, 1999, 99 (7), pp 1665–1688.

CARDOSO M.F.C., SILVA, F.C., SALOMÃO, K., CAVALEIRO, J.A.S., BOMBAÇA, A.C., CASTRO, S.L., ROCHA, D.R., FERREIRA, V.F. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of new 3-phenylthio-nor-b-lapachone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23 (2015) 4763–4768.

CARLMARK A, MALMSTRÖM E, MALKOCH M. Dendritic architectures based on bis-MPA: functional polymeric scaffolds for application-driven research. *Chem Soc Rev* 2013;42:5858–79.

CHENG, Y.; ZHAO, L.; LI, Y.; XU, T. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. *Chem. Soc. Rev.*, v.40, p.2673- 2703, 2011.

D. DUCHENE (Ed.), *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*, Edition de sante, Paris, 1987.

DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study. *J. Braz. Chem. Soc.* 2001, 12, 325-38.

DEYUE YAN, CHAO GAO, HOLGER FREY. *Hyperbranched Polymers: Synthesis, Properties, and Applications - Technology & Engineering*. Act. B. 2003, 92,137. 199.

DOS SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A. L.; DE ABREU, F. C.; CHIARI, E.; GOULART, M. D. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. *Planta Med.* 2001, 67, 92-93.

E. BLANCO, E.A. BEY, C. KHEMTONG, S.-G. YANG, J. SETTI-GUTHI, H. CHEN, C.W. KESSINGER, K.A. CARNEVALE, W.G. BORNEMANN, D.A. BOOTHMAN, J.

GAO. β -Lapachone micellar nanotherapeutics for non-small cell lung cancer therapy, *Cancer Res.* 70 (2010) 3896–3904.

ELHAM ABBASI, SEDIGHEH FEKRI AVAL, ABOLFAZL AKBARZADEH, MORTEZA MILANI, HAMID TAYEFI NASRABADI, SANG WOO JOO, YOUNES HANIFEHPOUR, KAZEM NEJATI-KOSHKI AND ROGHIYEH PASHAEI-AS. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett.* 2014; 9(1): 247.

EMA ZAGAR AND MAJDA ZIGON. Characterization of a Commercial Hyperbranched Aliphatic Polyester Based on 2,2-Bis(methylol)propionic Acid. *Macromolecules*, Vol. 35, No. 27, 2002.

EMA ZAGAR, JOZE GRDADOLNIK, AN Infrared spectroscopic study of h-bond network in hyperbranched polyester polyol. *Journal of molecular structure.* 658 (2003) 143–152.

EMA ZAGARA, MAJDA ZIGON. Aliphatic hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(methylol)propionic acid-Determination of structure, solution and bulk properties. *Progress in Polymer Science* 36 ,2011, 53–88.

FANWEN ZENG AND STEVEN C. ZIMMERMAN. Dendrimers in Supramolecular Chemistry. From Molecular Recognition to Self-Assembly, *Chem. Rev.* 1997, 97, 1681-1712.

FELIU N, WALTER MV, MONTANEZ MI, KUNZMANN A, HULT A, NYSTRÖM A, MALKOCH M, FADEEL B. Stability and biocompatibility of a library of polyester dendrimers in comparison to polyamidoamine dendrimers. *Biomaterials* 2012;33:1970–81.

GARNIER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry* 1996, 42, 1315-20.

GEISIANE MARIA CAVALCANTE ALVES, LARISSA ARAÚJO ROLIM, PEDRO JOSÉ ROLIM NETO, ANA CRISTINA LIMA LEITE E DALCI JOSÉ BRONDANI, Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 2, 413-416, (2008).

GUPTA U, AGASHE HB, JAIN NK. Polypropylene imine dendrimer mediated solubility enhancement: effect of pH and functional groups of hydrophobes. *J Pharm Pharm Sci*. 2007; 10(3):358-67.

HARTMANN-THOMPSON, C.; KEELEY, D.L.; ROUSSEAU, J.R.; DVORNIC, P.R. Fluorescent dendritic polymers and nanostructured coatings for the detection of chemical warfare agents and other analytes. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, v.47, p.5101-5115, 2009.

HIEN, O.; KOMBER, H.; VOIT, B.; KRASTEVA, N.; YASUDA, A.; VOSSMEYER, T. *J. Nanostructured Polym. Nanocomposites (JNPN)* 2006, 2, 109.

HODGE P. Polymer science branches out. *Nature*. 1993;9:18–19.

HORCAJADA, C. SERRE, M. VALLET-REGÍ, M. SEBBAN, F. TAULELLE, G. FÉREY. *Angewandte Chemie International. Edition*, 2006, 45, 5974-5978.

HORCAJADA, C. SERRE, M. VALLET-REGÍ, M. SEBBAN, F. TAULELLE, G. FÉREY. *Angewandte chemie international. Edition* 2006, 45, 5974-5978.

INDAH NURITA KURNIASIH, JULIANE KEILITZ AND RAINER HAAG. Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers. *The Royal Society of Chemistry; Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 4145-4164.

ISABELLA M.F. CAVALCANTI, ELISÂNGELA A.M. MENDONÇA, MARIANE C.B. LIRA, SARA B. HONRATO, CELSO A. CAMARA, ROSA V.S. AMORIM, JOSUÉ MENDES FILHO, MARCELO M. RABELLO, MARCELO Z. HERNANDES, ALEJANDRO P. AYALA, NEREIDE S. SANTOS-MAGALHÃES. The encapsulation of

b-lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, p. 332–340, 2011.

JAIN K, KESHARWANI P, GUPTA U, JAIN NK. Dendrimer toxicity: let's meet the challenge. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 394, p.122–42, 2010.

JANG WD, KAMRUZZAMAN SELIM KM, LEE CH, KANG IK. Bioinspired application of dendrimers: from bio-mimicry to biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* V. 34, p.1–23, 2009.

JOSÉ LOURENÇO DE FREITAS NETO; GEISIANE MARIA ALVES PRESMICH; LARISSA ARAÚJO ROLIM; LARIZA DARLENE SANTOS ALVES; MIRACY MUNIZ DE ALBUQUERQUE; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO, Caracterização físico-química do potencial agente antineoplásico β -lapachona. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2012;33(4):545-553.

KLAJNERT, B., BRYCZEWSKA, M. *Dendrimers in Medicine*. Nova Science Pub., Inc., pp. p. 141, 2007.

KOO, B.W.; SONG, C.K.; KIM, C. CO Gas sensor based on a conducting dendrimer. *Sens. Actuators B*, v.77, p.432-436, 2001.

LIMA, O.G.; ALBUQUERQUE, I.; LIMA, C.G.; MAIA, M.H. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores – Comunicação XX: Atividade antimicrobiana de alguns derivados do lapachol em comparação com a xiloidona, nova orto-naftoquinona natural isolada de extratos do cerne do “Pau d’arco roxo”, *Tabebuia avellanadae* Lor. ex Griseb. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife/UFPE*. 4:3-17, 1962.

LIRA, M.C.B., FERRAZ, M.S., DA SILVA, D.G.V.C., CORTES, M.E., TEIXEIRA, K.I., CAETANO, N.P., SINISTERRA, R.D., PONCHEL, G., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* V. 64, p. 215–224, 2009.

LIU, K. C.; LI, J.; SAKYA, S. Synthetic approaches to the 2003 new drugs. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 1105-1125.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 4, 2004.

MALIK N, WIWATTANAPATAPEE R, KLOPSCH R, LORENZ K, FREY H, WEENER JW, MEIJER EW, PAULUS W, DUNCAN R. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of I-125-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release* v. 65:133–48, 2000.

MAZOLLA, A. A. Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional. *Revista Brasileira de Física Médica.*, v. 3, n. 1, p. 13, 2009.

MENDONÇA, E. A. M. et al. Enhanced Antiproliferative Activity of the New Anticancer Candidate LPSF/AC04 in Cyclodextrin Inclusion Complexes Encapsulated into Liposomes. *AAPS PharmSciTech*, Boston, v. 13, n. 4, p. 1355-1366, 10/02.

MILLER, L.L.; KUNUGI, Y.; CANAVESI, A.; RIGAUT, S. ; MOOREFIELD, C. N. ; NEWKOME, G. R. "Vapoconductivity" sorption of organic vapors causes large increases in the conductivity of a dendrimer. *Chem. Mater.*, v.10, p.1751-1754, 1998.

N. NASONGKLA, A.F. WIEDMANN, A. BRUENING, M. BEMAN, D. RAY, W.G. BORNMANN, D.A. BOOTHMAN, J. GAO, Enhancement of solubility and bioavailability of blapachone using cyclodextrin inclusion complexes, *Pharm. Res.* V. 20 p. 1626–1633, 2003.

NEWKOME GR, MOOREFIELD CN, VÖGTLE F. Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications. Wiley: Weinheim; 2001.

NEWKOME GR, YAO ZQ, BAKER GR, GUPTA VK. MICELLES. Part 1. Cascademolecules: a new approach to micelles, a-arborol. The Journal of Organic Chemistry v. 50, p. 2003–4, 1985.

NICHOLSON, J. W. The chemistry of polimers. 4ª edição. The Royal Society of Chemistry . Cambridge CB4 0WF, UK, 2012.

P. GERMAINA, J.M. LEÂTOFFEÂ, M.P. MERLINA, H.J. BUSCHMANN. Thermal behaviour of hydrated and anhydrous cucurbituril a dsc, t.g. and calorimetric study in temperature range from 100 to 800 k. Thermochemica acta 315 (1998) 87-92.

PARK, C.; IM, M.S.; LEE, S.; LIM, J.; KIM, C. Tunable fluorescent dendron-cyclodextrin nanotubes for hybridization with metal nanoparticles and their biosensory function. Angew. Chem. Int. Ed., v.47, p.9922-9926, 2009.

PINTO, A.V., CASTRO, S.L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. Molecules, v. 4, p. 4570–4590, 2009.

PINTO, C. N.; DANTAS, A. P.; DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; POLEQUEVITCH, P. F.; PINTO, M. C. F. R.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 2000, 50, 1120-28.

RIBEIRO, K.A.L., CARVALHO, C.M., MOLINA, M.T., LIMA, E.P., LÓPEZMONTERO, E., REYS, J.R.M., OLIVEIRA, M.B.F., PINTO, A.V., SANT'ANA, A.E.G., GOULART, M.O.F.. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), Nvector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* v. 111, p. 44–50, 2009.

RUTH DUNCAN, LORELLA IZZO. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volume 57, Issue 15, 14 December 2005, Pages 2215–2237.

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A. L.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1199-1202.

SIEGEL, D., YAN, C., ROSS, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinines. *Biochem. Pharmacol.* v. 83, p. 1033–1040, 2012.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quím. Nova* 2003, 26, 407.

SILVERSTEIN, R. M.; BRASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. . 6. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. 460.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos. 7ª ED. RIO DE JANEIRO: LTC, 2007.

SITÔNIO, MARÍLIA MARIA; CARVALHO JÚNIOR, CARLSON H. R.; CAMPOS, INGRID DE A., SILVA, JOSÉ BRUNO NUNES FERREIRA; LIMA, MARIA DO CARMO ALVES; GÓES, ALEXANDRE J. S.; MAIA, MARIA BERNADETE SOUSA; ROLIM NETO, PEDRO J.; SILVA, TERESINHA G. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (β -lapachone). *Inflammation Research* v. 62, p. 107-113, 2013.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E.; J. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* Jan 29; 70 (1-2), p. 1-20, 2001

SOUZA-SILVA, F., PEREIRA, B.A.S., SILVA, W.S., ALVES, C.R., NASCIMENTO, S.B., CARNEIRO, P.F., BOURGUIGNON, S.C., PINHO, R.T. Evidences for leishmanicidal activity of the naphthoquinone. *Experimental Parasitology* v. 147, p. 81–84, 2014.

SOYOUNG LIM, HYUNUK KIM, NARAYANAN SELVAPALAM, KYUNG-JIN KIM, SUNG JUNE CHO, GON SEO, KIMOON KIM. Cucurbit[6]uril: organic molecular porous material with permanent porosity, exceptional stability, and acetylene sorption properties. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47, 3352–3355.

STEVEN J. BARROW, SETU KASERA, MATTHEW J. ROWLAND, JESÚS DEL BARRIO, AND OREN A. SCHERMAN. Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chem. Rev.* 2015, 115, 12320–12406.

SUMEET MAHAJAN, TUNG-CHUN LEE, FRANK BIEDERMANN, JAMES T. HUGALL, JEREMY J. BAUMBERGA AND OREN A. SCHERMAN. Raman and sers spectroscopy of cucurbit[n]urils, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 10429–10433.

TEIXEIRA, M. J.; ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA, J. R. C. JR.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S. POMPEU, M. M. L. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytother. Res.* 2001, 15, 44-57.

TOMALIA DA. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichimica Acta*. 2004;9:39–57.

VALERIA N. SUELDO OCCELLO, RITA H. DE ROSSI, ALICIA V. VEGLIA, Complexation (cucurbit[6]uril-pyrene thermodynamic and spectroscopic properties. *JOURNAL OF LUMINESCENCE* 158 (2015) 435–440.

VALERIA N. SUELDO OCCELLO, RITA H. DE ROSSI, ALICIA V. VEGLIA, Complexation (cucurbit[6]uril-pyrene thermodynamic and spectroscopic properties. *Journal of Luminescence* , v. 158, p. 435–440, 2015.

WILLCOX, L., GILBERT, ,B. Traditional medicinal plants for the treatment and prevention of human parasitic diseases. *Ethnopharmacology* v. 1, p. 199-208, .2009.

ZANI, C. L.; CHIARI, E.; KRETTLI, A. U.; MURTA S. M. F.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; ROMANHA, A. Anti-plasmodial and anti-trypanosomal activity of synthetic naphtho [2, 3-b] thiophen-4, 9-quinones. *J. Bioorg. Med. Chem.* 1997, 5, 2185-2195.