



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

CYBELLY MARQUES DE MELO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA E
INCREMENTO DO SEU PERFIL DE DISSOLUÇÃO ATRAVÉS DA OBTENÇÃO DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Recife

2015

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

CYBELLY MARQUES DE MELO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA E
INCREMENTO DO SEU PERFIL DE DISSOLUÇÃO ATRAVÉS DA OBTENÇÃO DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Felts de La Roca Soares

Coorientador: Prof^º. Dr^º. Pedro José Rolim Neto

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Melo, Cybelly Marques de

Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão/ Cybelly Marques de Melo- Recife: O Autor, 2015.

125 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Monica Felts de La Roca Soares

Coorientador: Pedro José Rolim Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui referências

1. Alcalóides 2. Doenças 3. Terapêutica I. Soares, Monica Felts de La Roca (orientadora) II. Rolim Neto, Pedro José (coorientador) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-063

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA E
INCREMENTO DO SEU PERFIL DE DISSOLUÇÃO ATRAVÉS DA OBTENÇÃO DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO

CYBELLY MARQUES DE MELO

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2015, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

Membros Externos Titulares

Prof^a. Dr^a. Larissa Araújo Rolim – Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof^a. Dr^a. Magaly Andreza Marques de Lyra – Universidade Federal de Pernambuco

Membro Interno Titular:

Prof^a. Dr^a. Mônica Felts de La Roca Soares - Universidade Federal de Pernambuco

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Isidro Farias

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Arruda de Moraes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

*Aos meus pais, José Marques e Maria
Consuelo e a minha irmã Cintya, com
amor!*

MELO, C.M. Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me conduzir e me conceber oportunidades, sem Ele a guiar os meus passos não chegaria até aqui;

À Prof^a. Dr^a. **Mônica Felts**, minha orientadora, agradeço muito pela oportunidade, por tudo que me ensinou e pelo voto de confiança de fazer parte da equipe do NCQMC, obrigada por tudo!

Ao Prof^o **Pedro Rolim** por tudo que fez (e ainda faz) por mim durante todos esses anos de convivência, por todo o carinho demonstrado, pelo total apoio na execução deste trabalho. Sempre disposto a ajudar no que fosse preciso, sem medir esforços. Gostaria que soubesse o quanto lhe admiro e serei eternamente grata!

Ao Prof^o. Dr. **Lamartine Soares**, pelos ensinamentos, paciência e por toda ajuda!

Ao Prof. Dr. **José Roberto de Souza de Almeida Leite** e a Dr^a **Leiz Maria Costa Veras** pela paceria estabelecida neste projeto e pela doação da matéria prima.

A Prof^a Dr^a **Larissa Rolim** por todo carinho, apoio e contribuições durante a execução deste trabalho, de fundamental importância para a publicação do primeiro artigo do projeto da epiisopiloturina. Meus sinceros agradecimentos!

A Dr^a **Lariza Alves**, por todo o tempo dedicado e toda ajuda na parte experimental deste trabalho.

A todos que formam hoje o **Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC)**, que de forma direta ou indireta sempre me ajudaram. Formamos hoje um grupo unido, parceiro, que trabalha em equipe e que isto nunca mude! Ganhei verdadeiros amigos durante este tempo e espero, de coração, que os laços estabelecido por nós, sempre se fortaleçam!

À todos que formam o **Laboratório de Tecnologia dos medicamentos (LTM)** , que me acolheram e me ensinaram muito. Sei o quanto aperiiei a todos e este trabalho também tem um pouco de cada um de vocês!!! Agradeço imensamente!

Aos meus amados pais, **José Marques e Maria Consuelo**, pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo, pelos abraços nos dias difíceis e por todo o sacrifício e dificuldades, que eu sei que passaram, para dar a mim e a minha irmã até o que não tinham se fosse o caso. Em meio a tudo que passamos, se hoje estou conquistando mais um dos meus objetivos é sim, graças a vocês. Serei eternamente grata, por tudo! Amo vocês!

À **Cintya Marques**, minha irmã, que sempre foi um exemplo para mim de força e determinação. Meu amor e ao mesmo tempo meu maior abuso. Como irmã mais velha sempre cuidou de mim, sempre dando o seu melhor para me ajudar. Pinha, obrigada pelas palavras de apoio, pela paciência... Te amo!

Aos meu “filhos”, meus cachorros **Flor e Marty**, pelos momentos de plena felicidade ao lado dos dois! Que, mesmo sem saber, são de fundamental importância na minha vida!

À toda minha família, em especial para a minha princesa e mais nova integrante da família, minha afilhada **Julie Maria**! Porque os momentos ao seu lado são mágicos, e meu amor por você não tem como expressar em palavras, você veio para trazer muita alegria a mim, aos seus pais e a todos que lhe cercam !!! Te amo minha dindinha!

À **Amanda Quintas**, pela sua sincera amizade e total apoio durante todo esse tempo. Minha Carlinha, minha doutoranda..... Não tenho palavras para lhe agradecer por tudo que me ensinou e ainda ensina. Sempre ao meu lado, me ajudando com toda paciência do mundo. Dentre as coisas boas que ganhei nestes últimos anos, a sua amizade é sem dúvida uma delas. Mil vezes obrigada!

A família Epiisopiloturina: **Amanda, André Nascimento** e as novas integrantes **Jaciane e Patrícia**. Agradeço a todos pelo esforço e apoio em todas as etapas deste trabalho... não sei o que seria de mim sem a ajuda de vocês!!!

Aos meus amigos: **Leslie Raphael**, presente que ganhei durante a graduação e espero levar comigo pelo resto da vida. Um amigo para todas as horas, problemas e sorrisos... amo tu doido!!!! **Camila Figueirêdo**, meu xodôzinho, lhe admiro demais, pessoa maravilhosa que tive o prazer de conviver durante todo esse tempo. Serei sempre grata por todo o seu apoio!! **Salvana Costa**, pelo companheirismo, pela amizade sincera, pelo apoio durante a execução das análises, beijão Sal e muito obrigada.! A **Marciana Cordeiro**, que da forma “agoniada” que só ela tem, me ajudou tanto, foi minha companheira de todas as horas... do mestrado até a velhice gata!. A vocês, peças fundamentais na minha vida, que participaram diretamente desta minha fase! muito obrigada!

A todos que de forma indireta fizeram parte deste trabalho, fica aqui meu sincero agradecimento!

AGRADECIMENTO AS INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, por toda a estrutura oferecida.

A Universidade de Toronto, representada pelo Prof. Dr. Ping I. Lee, pela parceria estabelecida na execução do projeto e pela disponibilização de equipamentos utilizados.

A indústria Anidro do Brasil Extrações S. A., situada em Parnaíba (PI), pela doação da matéria-prima Epiisopiloturina.

Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) pela disponibilização de toda estrutura e equipamentos além de todo o suporte oferecido para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Física, da UFPE, na pessoa de Tarcyla Andrade, pelas análises de DRX realizadas.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento da bolsa de mestrado.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

RESUMO

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

A epiisopiloturina (EPI), um alcalóide extraído do resíduo de produção da pilocarpina, tem demonstrado promissora atividade anti-leishmaniose e esquistossomicida *in vitro* (doenças negligenciadas). Entretanto, por se tratar de um protótipo à fármaco, suas características físico-químicas ainda são pouco esclarecidas. A literatura indica ainda que EPI apresenta baixa solubilidade aquosa, condição que se apresenta como um entrave na dissolução deste protótipo, podendo repercutir na sua absorção e biodisponibilidade. Uma das alternativas tecnológicas para incrementar tal propriedade é a complexação com ciclodextrinas (CDs), polímero capaz de interagir com o fármaco hidrofóbico, aumentando a solubilidade. Assim, este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização físico-química da EPI, verificar sua compatibilidade físico-química frente a excipientes farmacêuticos e incrementar seu perfil de dissolução por meio da obtenção de complexos de inclusão (CI) com as seguintes CDs: β CD, sulfobutiléter- β CD e hidroxipropilmetil- β CD, por liofilização. A análise por Infravermelho e o perfil térmico da EPI obtido estão de acordo com a literatura, confirmando a identificação da molécula. A caracterização por Difração de Raios-X e Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciou o comportamento cristalino da EPI. A obtenção da cinética de degradação não-isotérmica revelou uma reação de ordem 1, com energia de ativação de $88,95 \text{ kJ.mol}^{-1}$. O pKa da EPI, detectado por meio do Sirius T3[®], foi de 7,29, demonstrando que a molécula se encontra em sua maior parte ionizada no meio durante toda a extensão do trato gastrointestinal. No perfil de dissolução, aos 15 minutos, a EPI apresentou 97,34% de dissolução em pH 1,2 e 48,1% em meio pH 6,8. No estudo de compatibilidade, verificou-se que EPI é compatível com todos os excipientes testados (lactose monohidratada; Amido de milho; Celulose Microcristalina; Polivinilpirrolidona K-30 e Hidroxipropil metil celulose. A formação de CI da EPI com as CDs foi confirmada pelas mesmas técnicas de caracterização, que evidenciaram indícios de fortes interações entre o protótipo e todas as CDs testadas, repercutindo em incremento do perfil de dissolução da EPI em pH 6,8 (1,8 vezes). Observou-se também a interessante associação da EPI com as CDs na forma de mistura física, sem o processamento das amostras. O contato destes materiais foi favorável a molhabilidade da EPI o que proporcionou aumento na taxa de dissolução da EPI. Assim, é possível concluir que a caracterização do protótipo forneceu subsídios para compreensão de suas limitações e vantagens, e que a EPI se mostrou compatível frente aos excipientes empregados na obtenção de formas farmacêuticas sólidas. A complexação com CDs incrementou de forma satisfatória o perfil de dissolução do protótipo, sendo estes potenciais excipientes para o ajuste desta propriedade.

Palavras Chaves: Epiisopiloturina. Incremento de Solubilidade. Ciclodextrinas.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

ABSTRACT

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

The Epiisopiloturine (EPI), an alkaloid extracted from the residue production of pilocarpine, has shown promising anti-leishmaniasis activity in vitro and schistosomicidal (neglected diseases). However, in the case of a prototype the drug, its physical and chemical characteristics are still unclear. The literature also indicates that EPI has low aqueous solubility, a condition that appears as a barrier for the dissolution of this prototype and can pass on their absorption and bioavailability. One of the technological alternatives to increase the property is complexation with cyclodextrins (CDs) polymer capable of interacting with the hydrophobic drug by increasing the solubility. Thereby, this study aims to define the physical-chemical characterization of EPI, check their physical and chemical compatibility against pharmaceutical excipients and increase its dissolution profile by obtaining inclusion complexes (IC) with the following CDs: β CD, sulfobutylether- β CD and hydroxypropyl- β CD by lyophilization. The infrared (IR) analysis and the thermal profile of the EPI obtained are according to the literature, confirming the identification of the molecule. The characterization by X-ray diffraction and scanning electron microscopy showed the crystalline behavior of EPI. Obtaining the non-isothermal degradation kinetics revealed a reaction order 1, with activation energy of $88.95 \text{ kJ.mol}^{-1}$. The pKa of EPI detected by Sirius T3[®] was 7.29, showing that the molecule is mostly ionized in the medium for the entire length of the gastrointestinal tract. In the dissolution profile, after 15 minutes, The EPI presented 97.34% dissolution at pH 1.2 and 48.1% in medium pH 6.8. In compatibility study, it was found that EPI is compatible with all the tested excipients (lactose monohydrate, maize starch, microcrystalline cellulose, Polyvinylpyrrolidone K-30, hydroxypropyl methyl cellulose). The IC formation of EPI with DCs was confirmed by the same characterization techniques, which showed evidence of strong interactions between the prototype and all tested CDs, reflecting the increase in EPI the dissolution profile at pH 6.8 (1.8 times). Also noted up the interesting combination of EPI with the CDs in the form of physical mixture, without the sample processing. The contact of these materials was favorable wettability of EPI which provided increased dissolution rate of EPI. Thus, we conclude that the characterization of the prototype provided information for understanding its limitations and advantages, and that EPI proved compatible front of the excipients employed in producing solid dosage forms. The complexation with the CD satisfactorily increased dissolution profile of the prototype, with these potential excipients for adjusting this property.

Key Words: Epiisopiloturine. Increase Solubility. Cyclodextrins.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Jaborandi jovem (<i>Pilocarpus microphyllus</i>).....	31
Figura 2 – Estrutura dos alcalóides encontrados no gênero <i>Pilocarpus</i>	32
Figura 3 - Formação de dextrinas cíclicas e acíclicas a partir do amido. a) amido b) dextrinas cíclicas e acíclicas.	43
Figura 4 - a) Estrutura molecular geral das CDs. O radical n representa o local de adição das unidades de glicose, formando assim os diferentes tipos de CDs. b) estrutura das ciclodextrinas naturais.....	44
Figura 5 - representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas.	46
Figura 6 - Substituintes de maior destaque, utilizados nas substituições dos hidrogênios presentes nas hidroxilas das CDs.	47
Figura 7 - representação esquemática da formação de complexos de inclusão entre a molécula hóspede e a CD.....	49
Figura 8 – Fluxograma do estudo de compatibilidade térmica	58
Figura 9 - Aspecto Macroscopico da EPI.....	62
Figura 10 - Espectro de absorção na região do infravermelho da Epiisopiloturina	63
Figura 11 - Distribuição das espécies: ionizada e não ionizada, no valor de pKa estabelecido a partir do equipamento Sirius T3®	64
Figura 12 - Difratoograma da EPI.....	65
Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura da EPI, sob aumento de 2.300 vezes.....	65
Figura 14 – Curva DSC da EPI, sob razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	66
Figura 15 - Curva TG, DTG e DTA da EPI, sob razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	67
Figura 16 - Curvas TG da EPI nas diferentes razões de aquecimentos (2,5; 5; 10; 20 e 40° C), sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	68
Figura 17 - a) Gráfico log A vs.K ⁻¹ ; b) Gráfico da função G(x) vs. Inverso da temperatura de	68
Figura 18 - Perfil de dissolução da EPI em pH 1,2.	70
Figura 19 - Perfil de dissolução em meio pH 6,8.....	71

Figura 20 - Cromatograma da mistura de padrões de pilocarpina (pico 1) e de epiisopiloturina (pico 2), diluídas em água.....	72
Figura 21 – Cromatograma obtido após alteração da fase móvel. EPI apresentando um tempo de retenção de 8,42 min, fluxo da fase móvel de 1mL/min, com volume de injeção de 20µL	74
Figura 22 - Cromatográficos para a EPI frente a modificação na temperatura do forno e volume de injeção	75
Figura 23 - Cromatogramas da EPI nas proporções de FM (a) 90:10 e (b) 60:40 (fase aquosa:orgânica).	76
Figura 24 – Cromatograma da EPI frente a mudança de pH da FM para 5,0.	77
Figura 25 – Curvas DSC da EPI e suas misturas físicas, sob razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	78
Figura 26 – Curvas TG da EPI, PVP K-30 e sua mistura física, sob razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	80
Figura 27 – Curvas TG da EPI, lactose e sua mistura física, sob razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	81
Figura 29 - Curvas TG da mistura física EPI:lactose nas diferentes razões de aquecimentos (5; 10; 20 e 40° C), sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	82
Figura 30 - a) Gráfico log A vs.K ⁻¹ ; b) Gráfico da função G(x) vs. Inverso da temperatura de EPI.....	83
Figura 31 – Espectros de infravermelho da EPI, lactose e sua mistura física antes e após aquecimento até 150°C.....	84
Figura 32 – Difrátogramas da EPI, lactose e mistura física.....	85
Figura 33 - Complexo EPI: βCD, exemplificando o aspecto da amostra antes da retirada do liofilizador.	86
Figura 34 - Aspecto macroscópico do complexo EPI: βCD (a) em comparação com a imagem da EPI pura (b), evidenciando a semelhança entre as duas amostras.....	87
Figura 35 - Aspecto macroscópico dos complexos EPI: SBβCD (a) e EPI: HPβCD (b).....	87
Figura 36 - Espectro de infra-vermelho das amostras de CI EPI:βCD e MF EPI:βCD, sendo comparadas com as amostras de EPI e βCD isoladas.....	88
Figura 38 - Espectro de infra-vermelho das amostras de CI EPI:HPβCD e MF EPI:HPβCD, sendo comparadas com as amostras de EPI e βCD isoladas.....	90
Figura 39 - Difrátogramas da EPI, complexos de inclusão e misturas físicas.....	91

Figura 40 - Curvas DSC da EPI e das MFs e CIs obtidos, sob razão de aquecimento de 10°C.min-1 e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min-1.	93
Figura 41 - Curvas TG da EPI, β CD, CI e MF EPI: β CD, em razão de aquecimento de 10°C, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min ⁻¹	94
Figura 42 - Curvas TG da EPI, HP β CD, CI e MF EPI:HP β CD, em razão de aquecimento de 10°C, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min-1.	95
Figura 43 - Curvas TG da EPI, CI e MF EPI:SB β CD, em razão de aquecimento de 10°C, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min-1.F	95
Figura 44 – Perfil de dissolução de todas as amostras analisadas.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas das ciclodextrinas naturais.	45
Tabela 2 - Quantidade equimolar de CD's utilizadas na formação de complexos de inclusão (CI) com a EPI.	59
Tabela 3 - Linearidade das diferentes ordens de reação da cinética de degradação da EPI	69
Tabela 4 – Dados cromatográficos para a EPI frente a modificação na temperatura do forno e volume de injeção	75
Tabela 5 - Dados cromatográficos para a EPI frente a variação quanto a proporção de fase orgânica na FM.	76
Tabela 6 – Valores extraídos das curvas DSC para a EPI e suas misturas físicas.	79
Tabela 7 - Valores extraídos das curvas TG para a EPI e as misturas físicas.	81
Tabela 8 - Linearidade das diferentes ordens de reação da cinética de degradação da mistura física EPI:lactose.	83
Tabela 9 - Valores extraídos das curvas DSC para a EPI, CI e suas misturas físicas.	93
Tabela 10 - Valores extraídos das curvas DSC para a EPI, CI e suas misturas físicas.	96
Tabela 11 - valores obtidos a partir da dissolução das amostras analisadas, em pH 6,8. Eficiência de dissolução de EPI dissolvido, nos tempos 0; 5; 15 ; 30 ; 69 3 90 min. Representadas em valores percentuais.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Atividade esquistossomicida da EPI.	33
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
3.1 ALCALÓIDES COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	28
3.1.1 Epiisopiloturina: Protótipo para o tratamento de doenças negligenciadas	30
3.1.1.1 Atividade esquistossomicida.....	33
3.1.1.2 Atividade leishmanicida	33
3.1.1.3. Atividade anti-inflamatória	34
3.1.1.4 Atividade antinoceptica	34
3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS	34
3.2.1 Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho.....	35
3.2.2 Difração de Raios-X.....	36
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
3.2.4 Análise Térmica	37
3.2.4.1 Estudo de compatibilidade por Análise Térmica	38
3.2.4.2 Determinação da cinética de degradação dinâmica de compostos farmacêuticos.....	40
3.2.5 Determinação do pKa.....	41
3.3 CICLODEXTRINAS COMO ALTERNATIVA PARA O INCREMENTO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FÁRMACOS	42
3.3.1 Histórico e conceito das ciclodextrinas	43
3.3.2 Características das Ciclodextrinas.....	44
3.3.3. Ciclodextrinas naturais X Ciclodextrinas modificadas	46
3.3.4 Formação de complexos de inclusão.....	48

4 MATERIAL E MÉTODO	51
4.1 PARTE 1 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA.....	51
4.1.1 MATERIAL	51
4.1.2 MÉTODO.....	51
4.1.2.1 Identificação por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	51
4.1.2.2 Determinação do pKa	51
4.1.2.3 Difração de Raios-X.....	52
4.1.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	52
4.1.2.5 Análise Térmica.....	53
4.1.2.6 Otimização do método de quantificação da epiisopiloturina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	54
4.1.2.7 Avaliação do perfil de dissolução da epiisopiloturina.....	55
4.1.2.8 Preparo das amostras	56
4.1.2.9 Condições empregadas na dissolução.....	56
4.2 PARTE 2 - ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FRENTE A EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS	57
4.2.1 MATERIAL	57
4.2.2. Obtenção das Misturas Físicas	57
4.2.3 Estudo de Compatibilidade Protótipo-Excipiente	57
4.3 PARTE 3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO A BASE DE EPIISOPILOTURINA.....	59
4.3.1 Obtenção dos complexos de inclusão e misturas-física.....	59
4.3.2 Caracterização físico-química dos complexos de inclusão obtidos.....	59
4.3.2.1 Avaliação do perfil de dissolução da epiisopiloturina versus complexos de inclusão.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 PARTE 1 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA.....	62

5.1.1 Aspecto macroscópico da EPI.....	62
5.1.2 Identificação por Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho.....	62
5.1.3 Determinação do pKa.....	63
5.1.4 Difração de Raios-X.....	64
5.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	65
5.1.6 Análise Térmica	66
5.1.6.1 Calorimetria exploratória diferencial.....	66
5.1.6.2 Termogravimetria.....	66
5.1.7. Perfil de dissolução da epiisopiloturina.....	69
5.1.8. Otimização de método de quantificação da epiisopiloturina por CLAE.....	71
5.1.8.1 Alteração da fase móvel (FM): substituição do ácido fosfórico por ácido fórmico	73
5.1.8.2 Determinação dos demais parâmetros do método de quantificação.....	74
5.2 PARTE 2 - ESTUDO DE COMPATIBILIDADE TÉRMICA FRENTE AOS EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS	78
5.2.1 Estudo de Compatibilidade Protótipo-Excipiente	78
5.2.1.1 DSC	78
5.2.1.2. TG.....	80
5.2.2. Análises complementares.....	82
5.2.2.1 Cinética de degradação térmica da Mistura Física EPI: lactose (1:1)	82
5.2.2.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho e Difração de Raio-X.	84
5.3 PARTE 3 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO A BASE DE EPIISOPILOTURINA.....	85
5.3.1 Obtenção de complexos de inclusão por liofilização	85
5.3.2 Caracterização físico-química dos complexos de inclusão obtidos.....	88
5.3.2.1. Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho	88
5.3.2.2. DRX	90
5.3.2.3 Compatibilidade Protótipo-CD para obtenção de complexos de inclusão	92

5.3.2.3.1 DSC	92
5.3.2.3.2 TG.....	94
5.3.2.3 Avaliação do perfil de dissolução da epiisopiloturina versus complexos de inclusão.....	97
6 CONCLUSÃO	102
7 PERSPECTIVAS	105
8 REFERÊNCIAS	107

Introdução

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são aquelas que acometem predominantemente a população de maior índice de pobreza do mundo, e no âmbito industrial não representam um mercado lucrativo para as grandes indústrias, em comparação a doenças cardíacas, obesidade e doenças psiquiátricas, como a depressão. (CASTRO, 2012). As doenças negligenciadas incapacitam ou matam milhões de pessoas e representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida (INCT, 2014). Embora responsáveis por 11,4% da carga global de doenças, apenas 1,3% dos novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004 foram desenvolvidos para esta finalidade (DIAS; DESSOY, 2009).

Assim, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos. (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Neste contexto, o jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus*) é umas das espécies mais exploradas comercialmente, devido à produção do alcaloide pilocarpina, o qual possui finalidades terapêuticas diversas, tais como: redução da pressão intraocular, combate a xerostomia e estímulo da musculatura lisa gastrointestinal (SAWAYA et al., 2011). Apesar do vasto conhecimento desta espécie, a extração de porte industrial da pilocarpina gera ao final do processo uma biomassa rica em diversos compostos não aproveitados para a saúde (MIURA, 2009). Dentre estes compostos, a epiisopiloturina (EPI) é o alcaloide de maior rendimento e apresentou promissoras atividades frente às doenças negligenciadas, tais como leishmaniose (MIURA, 2009) e esquistossomose (VERAS et al., 2012), além das suas atividades anti-inflamatória e antinoceptiva (SILVA et al., 2013).

Entretanto, por se tratar de um protótipo, a EPI não possui parâmetros de qualidade definidos, sendo poucas as informações a respeito de suas propriedades físico-químicas, o que se torna um entrave na tentativa de transformá-la numa futura forma farmacêutica visando o tratamento de tais doenças negligenciadas. Neste contexto, torna-se de fundamental importância o emprego de técnicas de caracterização, que permitem conhecer profundamente os candidatos à fármaco (VIEIRA et al 2013; LYRA et al 2010).

Dentre estas técnicas, pode-se destacar a Espectroscopia de absorção na região do infravermelho, Difração de Raio-X, Microscopia Eletrônica de Varredura e análise térmica (Termogravimetria, Calorimetria exploratória Diferencial). O somatório de resultados obtidos através destas técnicas torna possível a obtenção de informações sobre o comportamento das novas

entidades químicas, como: Cristalinidade, propriedades físico-químicas das substâncias, informações sobre interações fármaco-excipientes, determinação parâmetros cinéticos, entre outras (MAXIMILIANO et al., 2010; MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010).

Guimarães e colaboradores (2013) evidenciam em seus estudos a baixa solubilidade aquosa da EPI, e na tentativa de contornar este entrave, destaca-se a utilização de técnicas capazes de proporcionar o incremento da solubilidade e consequentemente o aumento da taxa de dissolução de compostos lipossolúveis (LYRA et al., 2010). As mais utilizadas incluem a formulação de formas amorfas sólidas, nanopartículas, microemulsões, dispersões sólidas, extrusão por fusão, formação de sal e obtenção de complexos de inclusão (SOARES-SOBRINHO 2009). Aumentando através destas a solubilidade aparente de fármacos pouco solúveis (LAFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2005).

Neste contexto, as ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, oriundos da degradação do amido, que apresentam em seu interior uma cavidade de caráter hidrofóbico e uma superfície externa hidrofílica (devido à presença de hidroxilas livres). Esta característica atribui as ciclodextrinas a propriedade de complexar em seu interior moléculas lipossolúveis, formando assim complexos de inclusão com estas. A partir deste processo, é possível observar uma melhoria na dissolução de compostos de baixa solubilidade (Del Valle 2004; ZHANG; MÁ, 2013; XU et al., 2014).

Assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar o protótipo, bem como promover o incremento da solubilidade aquosa da EPI através da complexação deste com algumas ciclodextrinas, pelo método de liofilização. Os resultados obtidos serão um valioso instrumento para elucidação de suas características e assim ser possível traçar estratégias para o desenvolvimento racional de uma formulação segura e de qualidade.

Objetivos

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização físico-química da molécula epiisopiloturina e promover o incremento do seu perfil de dissolução por meio de complexos de inclusão.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o protótipo epiisopiloturina através de ensaios químicos e físico-químicos;
- Determinar o pKa por Sirius T3[®];
- Otimizar o método analítico de quantificação da epiisopiloturina;
- Avaliar a compatibilidade físico-química do protótipo frente a excipientes farmacêuticos e Ciclodextrinas;
- Obter complexos de inclusão com diferentes tipos de ciclodextrinas pelo método de liofilização;
- Caracterizar os complexos obtidos através das técnicas de Difração de Raios-x, Espectroscopia de absorção na região do infra-vermelho e análise térmica;
- Determinar a cinética de liberação por meio do perfil de dissolução dos complexos formados.

Revisão da literatura

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ALCALÓIDES COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças negligenciadas representam um dos principais problemas de saúde pública em mais de 70 países tropicais e subtropicais (STEINMANN et al., 2006) e, mesmo representando 80% da população mundial, correspondem apenas a 20% das vendas globais de medicamentos (ATAS, 2003). Os investimentos do governo brasileiro para pesquisa e desenvolvimento destinados a doenças negligenciadas giram em torno de 75 milhões de reais, anualmente (SANTOS et al., 2012), porém o conhecimento produzido não é revertido em avanços terapêuticos (novos fármacos, métodos de diagnósticos e vacinas) devido ao baixo potencial de retorno lucrativo de seu público alvo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A bioprospecção de plantas para uso como protótipos de novos medicamentos ganha espaço no desenvolvimento de fármacos destinados ao tratamento das doenças negligenciadas. Segundo Funari e Ferro (2005), a exploração ética da biodiversidade brasileira se faz de grande relevância dado o conhecimento popular abundante do país, principalmente quando destinadas ao tratamento deste tipo de enfermidades, pois a opção de conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades encurta o percurso do desenvolvimento de uma nova droga, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, de uma indicação de qual atividade biológica esta droga poderia apresentar.

O conhecimento dos alcalóides pelo homem data, aproximadamente, de 4 mil anos atrás e, desde então, têm sido utilizados no fabrico de medicamentos em poções, chás e venenos. Relata-se, por exemplo, que a morte de Sócrates, em 399 a.C., deveu-se à ingestão de uma solução contendo conina (*Conium maculatum*) e que Cleópatra utilizava extratos de *Hyoscyamus muticus*, contendo atropina, para fins estéticos. Ainda, muitas culturas antigas, como os gregos e romanos, faziam uso do extrato seco do curare (*Chondodendron tomentosum*), contendo o alcalóide tubocurarina, e a famosa estricnina extraída de *Strychnos nux-vomica* para serem usados como veneno em pontas de flechas empregadas na caça e em guerras (MARINHO, 2001).

Apesar do seu uso na medicina ser antigo, só no início do século XIX se conseguiu isolar algumas destas substâncias. A primeira droga a ser investigada quimicamente foi o ópio, extraída

da planta *Papaver somniferum*, utilizada há séculos devido às suas propriedades analgésicas e narcóticas. Em 1803, Derosne isolou um alcalóide semi-puro a partir do ópio e, em 1805, Sertürner, farmacêutico alemão, isolou e caracterizou este constituinte como morfina, reconhecendo a sua natureza básica (ROBERTS; WINK, 1998).

Atualmente, a literatura descreve varias aplicações terapêuticas para os alcalóides. Pérez e colaboradores (2003) verificaram, em seus estudos, a atividade antioxidante dos alcalóides 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina e dihidroqueleritrina, extraídos da casca da *Bocconia arborea*. Petkov e Stancheva (1980), por sua vez, descobriram a variedade da atuação farmacológica do alcaloide glaucina, como antitussígeno, antinociceptivo, anticonvulsivante e neuroléptico, após extração de *Glaucium flavum Crantz*, conhecida popularmente como papoula de chifres amarelos.

O gênero *Tabernaemontana* (família Apocynaceae) é rico em alcalóides indólicos monoterpênicos. Estes apresentam atividades antitumoral, antimicrobiana, anti-hipertensiva e estimulante do sistema nervoso central (HEIJDEN; VERPOORTE, HARKES, 1989). A partir dos estudos realizados na *Tabernaemontana salzmännii* (A. DC.) por Figueirêdo e colaboradores (2010), foi possível identificar e isolar nove alcalóides em sua casca, dois destes (isovoacangina e voacangina) mostraram-se capazes de induzir a morte celular por apoptose em células leucêmicas humanas THP-1.

Desta forma, o mercado farmacêutico dispõe de vasta gama de medicamentos a base de alcaloides, os quais são destinados ao tratamento de diversas doenças. Por exemplo, a vincristina e a vinblastina, antineoplásicos bastante aplicados na terapia de diversos tipos de câncer, são considerados de grande importância para a indústria farmacêutica, pois possuem valores de mercado estimados em US\$ 6.000/g (vincristina) e US\$ 12.000,00/g para a vimblastina. Outros exemplos são a ergotamina, a ioimbina e a reserpina, destinados ao tratamento da enxaqueca, distúrbios do fluxo sanguíneo e depressão, respectivamente (GOMES, 2008).

Outros estudos mostram a eficácia de alguns alcaloides frente às doenças negligenciadas. Gonzáles e colaboradores (2005) comprovaram a atividade *in vitro* de alcaloides diterpenóides contra a forma promastigota do parasita *Leishmania infantum*. Este efeito também foi verificado por Giorgio (2004) em seus estudos com os alcaloides: Harmane, harmina e harmalina.

Extraído da planta *Galipea longiflora*, o alcaloide 2- fenilquinolina (2Ph) apresenta atividade Leshimanicida, além de atuar nas células T do sistema imunológico, regulando a

processo de inflamação (MAGARIÑOS, 2013). De acordo com Leverrier e colaboradores (2013), híbridos sintetizados a partir de alcaloides apresentaram promissora atividade frente ao *T. cruzi*.

Recentemente, estudos realizados com o alcaloide epiisopiloturina (EPI), extraído das folhas de *P. microphyllus*, apresentaram sua promissora atividade frente ao *S. Mansoni* e *Leishmania amazonenses* em estudos *in vitro* (MIURA, 2009). Adicionalmente, estudos com esta mesma substância realizados por Silva e colaboradores (2013) demonstram sua também promissora atividade anti-inflamatória e antinoceptiva. Diante dos resultados apresentados por estes autores, a EPI passou a ser objeto de estudo deste trabalho.

3.1.1 Epiisopiloturina: Protótipo para o tratamento de doenças negligenciadas

A flora amazônica é rica em espécies medicinais de grande potencial econômico para a extração de princípios ativos (SABÁ et al., 2002). Dentre as espécies de maior interesse mundial destaca-se o jaborandi, pertencente ao gênero *Pilocarpus* e à família das Rutaceae. Há 16 espécies descritas para este gênero (SKORUPA, 1996), dentre estas 13 podem ser encontradas no Brasil e 11 ocorrem exclusivamente no território brasileiro (SANTOS; MORENO, 2004). O *Pilocarpus microphyllus* é considerado o “jaborandi legítimo” por apresentar o mais alto nível de alcaloides em suas folhas (CORREIA, 1984).

O Jaborandi foi primeiramente descrito no livro *O Tratado da Terra do Brasil*, elaborado por Fernão Gandim, português membro da corte de João Alvares Cabral, em meados de 1500 d.C. Entretanto, sua aplicação no tratamento de doenças foi mencionado apenas após os relatos do viajante naturalista Gabriel Soares de Souza, autor do livro *O Tratado Descritivo do Brasil*, onde destinava o uso da planta para o tratamento de feridas e na doença de Chagas. Adicionalmente, índios tupi-guaranis o denominaram de *ia-mbor-endi*, que significa “planta que faz babar”, por induzir a salivagem (CORREIA, 1984).

P. microphyllus (Figura 1) é uma planta arbustiva e bastante ramificada, apresentando altura média de dois metros, com folhas compostas medindo, em média, 40 cm e folíolos coriáceos, de forma lanceolada (HENRIQUES et al., 2000). As flores são pequenas, dispostas em ráculos (cachos) compactos. Os frutos são arranjados em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso. Esta planta é nativa da América do Sul, encontrada predominantemente no Paraguai, na Argentina e no Brasil, sendo comum nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MARQUES; COSTA, 1994).

Figura 1 – Jaborandi jovem (*Pilocarpus microphyllus*).



Fonte: MIURA, 2009.

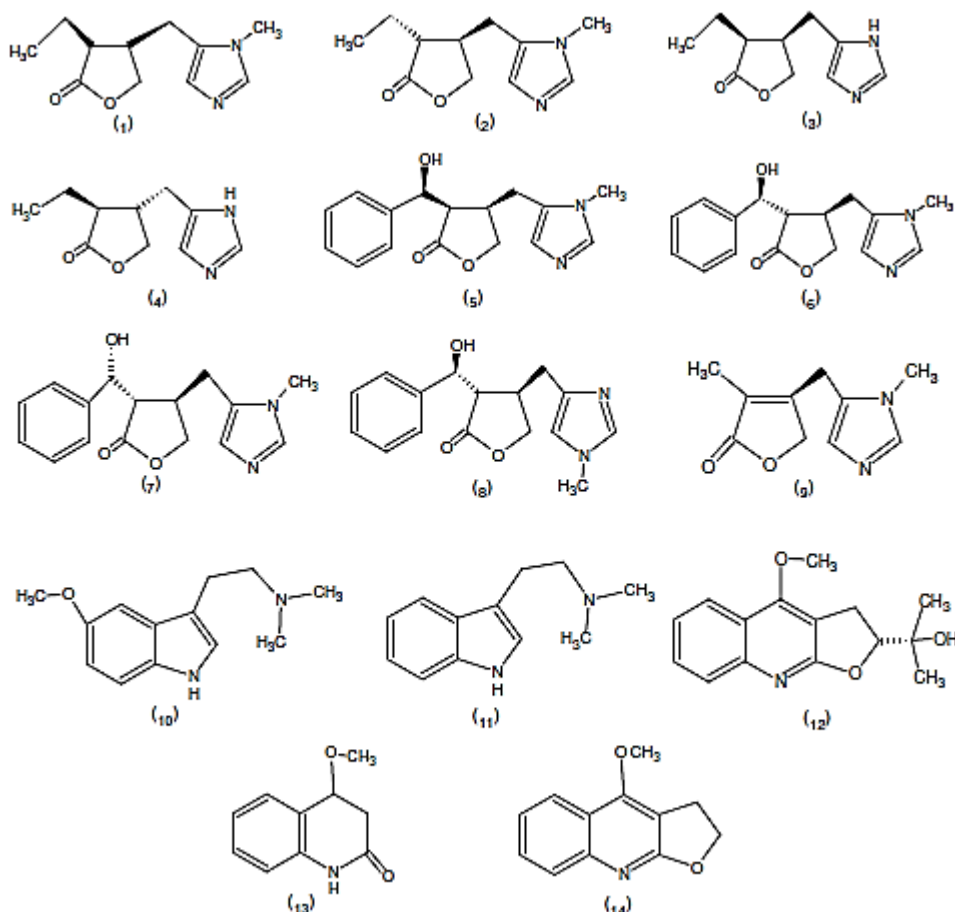
Esta espécie é um exemplo de planta que fez a transição entre o conhecimento popular para sua produção em larga escala (MIURA, 2009) devido à suas aplicações terapêuticas, sobretudo do alcaloide pilocarpina. Este fitofármaco é utilizado na medicina humana e veterinária desde 1874 e apresenta finalidades terapêuticas diversas, com destaque a redução da pressão intraocular, combate a xerostomia e estímulo da musculatura lisa gastrointestinal (LARSSON et al., 2008 ;SAWAYA et al., 2011; MIURA, 2009; VERAS et al., 2012).

Estas e outras aplicações terapêuticas fazem com que a exploração do jaborandi seja responsável por uma grande demanda de recursos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, movimentando nestas cerca de 220 toneladas, que custam aproximadamente R\$ 562.000,00 de um total de R\$ 3,7 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no país, de acordo com pesquisa realizada em 2006 (IBGE, 2006).

A extração e o isolamento da pilocarpina ocorrem em parceria entre a empresa Anidro Extrações do Brasil S.A. (Parnaíba, PI, Brasil) e a companhia farmacêutica Merck (Darmstadt, Alemanha) e envolve a produção de 10.000 kg de folhas por ano e rendimento médio de 1% deste fitofármaco (PINHEIRO, 2002). Após sua extração, é gerado um grande volume de resíduo (biomassa) composto por grande número de outras moléculas, a exemplo da isopilocarpina,

pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina (Figura 2) (SANTOS; MORENO, 2004).

Figura 2 – Estrutura dos alcalóides encontrados no gênero *Pilocarpus*



Legenda: (1) pilocarpina, (2) isopilocarpina, (3) pilocarpidina, (4) isopilocarpidina, (5) pilosina, (6) isopilosina, (7) epiisopilosina, (8) epiisopiloturina, (9) 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina (10) *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina, (11) *N,N*-dimetil-triptamina, (12) plastidesmina, (13) (1*H*)-4-metoxi-2-quinolone e (14) dictamina. Fonte: SANTOS e MORENO, 2004.

A epiisopiloturina (EPI) é a molécula mais abundante desta biomassa, com rendimento calculado em cerca de 2 kg para 1500 Kg das folhas de jaborandi. Trata-se de um alcaloide imidazólico que foi identificado em 1978 por Voightlander e colaboradores e seu isolamento permitiu a realização de estudos para elucidação de suas atividades biológicas.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

3.1.1.1 Atividade esquistossomícida

De acordo com Veras e colaboradores (2012), a EPI possui promissora atividade esquistossomícida quando avaliada em comparação ao tratamento de escolha atual, que faz uso do Praziquantel (PZQ). Apesar de a dose e o período de tratamento da EPI terem sido maiores que o PZQ, o protótipo apresenta maior extensão de atuação quanto as diferentes fases do ciclo de vida dos vermes de *S. Mansoni*. Adicionalmente o tratamento com a EPI inibiu irreversivelmente 100% da aptidão reprodutiva (ovoposição) dos vermes. O Quadro 1 apresenta as vantagens visualizadas pelos autores nos estudos realizados.

Quadro 1 – Atividade esquistossomícida da EPI.

	Grupo controle positivo (PZQ)	Grupo controle negativo (DMSO 0,5%)	Epiisopiloturina
Vermes adultos	Dose de 5µg/ml matou todos os vermes em 24 horas	---	Doses de 200 e 150µg/ml mataram todos os vermes em 72 e 120 horas, respectivamente.
Aptidão reprodutiva (ovoposição)	---	---	Usou-se as doses no intervalo entre 25 e 100 µg/mL, todas mostraram uma diminuição significativa e irreversível, sendo a de maior valor capaz de inibir 100% da ovoposição.
Esquistossômulos em diferentes idades (3 h a 1, 3, 5, e 7 dias)	---	---	Doses de 300 µg/mL mataram todos os esquistossômulos em 120 horas

Fonte: Veras et al., 2012.

3.1.1.2 Atividade leishmanicida

Miura (2009) demonstrou, através de ensaios *in vitro*, que a EPI apresentou significativa atividade contra a forma amastigota, fase parasitária real que causa a infecção em seres humanos e cães, do *Leishmania amazonenses*, na concentração de 128 µg/mL. Tal resultado merece destaque, uma vez que os medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento desta doença atuam apenas na fase promastigota (BANETH; SHAW, 2002; ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007).

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

3.1.1.3. Atividade anti-inflamatória

Com base nos resultados obtidos por Silva e Colaboradores (2013), foi possível verificar uma significativa atividade anti-inflamatória da EPI (pelo método de edema de pata e migração de neutrófilos). Sendo visualizada, nas três primeiras horas após a administração da EPI uma redução de 55, 70 e 85% do edema, enquanto que o grupo controle (utilizando como referência o medicamento Indometacina) apresentou uma inibição máxima de 55%, no mesmo intervalo de tempo, mostrando uma satisfatória atividade anti-inflamatória desta NEQ. Adicionalmente foi visto que o efeito anti-inflamatório da EPI depende da inibição de neutrófilos e leucócitos em liberarem citocinas pró-inflamatórias, como o $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$.

3.1.1.4 Atividade antinoceptica

Ainda nos estudos de Silva e Colaboradores (2013), foi avaliada também a atividade antinoceptica. Neste, a EPI foi capaz de diminuir as contorções abdominais de camundongos (teste de contorção por ácido acético) em 64% enquanto a substância padrão testada apresentou inibição de 98,3%. Além disto, viu-se que o mecanismo de inibição sensorial da dor não é feito de forma central (pelo teste com placa quente e ensaio com formalina).

3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

O conhecimento das características físico-químicas de uma matéria prima farmacêutica cumpre papel significativo na antecipação de problemas de formulação, além de auxiliar na identificação de rotas viáveis na tecnologia de obtenção de medicamentos (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; ARAÚJO, 2003; RODRIGUES et al., 2005; SOARES, 2011).

A caracterização é o foco principal dos estudos de pré- formulação (LAU, 2011), realizado nas etapas de pesquisa pré-clínica e clínica, visando acumular o máximo de informações sobre o comportamento do fármaco (RODRIGUES et al 2005), e a partir de então, serem desenvolvidas formulações mais eficazes e seguras e, conseqüentemente, com maiores possibilidades de êxito (COSTA, 2010; MAXIMIANO; COSTA; SOUZA, 2010). Neste processo, os protótipos a fármacos merecem destaque (SOVIZI, 2010), pois representam candidatura a novas alternativas terapêuticas para a sociedade, mas não possuem parâmetros de qualidade estabelecidos.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

Vieira e colaboradores (2013) evidenciam em seus estudos a importância da identificação e caracterização físico-química de novas entidades químicas (como o caso do GQ-130), além de estudos que norteiem sobre sua estabilidade. Onde a partir destes, é possível estabelecer um padrão de identificação da molécula para que posteriormente seja possível sua intervenção tecnológica de forma racional e assim garantir a sua qualidade.

Para tanto, são empregadas diversas técnicas analíticas na caracterização de fármacos no estado sólido, sendo as mais utilizadas: Espectrometria de absorção na região do infravermelho, difração de raio-X, microscopia eletrônica de varredura e análise térmica.

3.2.1 Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho

Define-se espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) como a medida da absorção, por parte de compostos químicos analisados, de uma radiação eletromagnética em que o comprimento de onda se situa na faixa de 10^{-4} a 10^{-2} cm, sendo este espectro único para cada substância com exceção aos isômeros ópticos que em solução apresentam espectros idênticos (KOROLKOVAS, 1984; COSTA, 2009).

O espectro infravermelho de uma substância é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, portanto, através das bandas dos grupos funcionais, essa técnica é capaz de identificar compostos. Além disso, pode ser utilizadas na análise quantitativa de misturas de compostos através da intensidade da banda característica de um composto da amostra (BRITAIN et al., 1991). Sendo possível verificar a interação entre duas substâncias através da comparação de seus espectros. Eventos como desaparecimento, surgimento ou deslocamento de bandas características fornecem indicativos de interações que podem ser prejudiciais, ou não para o produto formado.

3.2.2 Difração de Raios-X

Entre as várias técnicas experimentais disponíveis para a identificação de formas sólidas, incluindo polimorfos, solvatos, sais, co-cristais e formas amorfas, a difração de Raio-X (DRX) se destaca no estudo de formas sólidas. A DRX é baseado na lei de Bragg, em que o padrão de difração apresenta uma série de reflexões, as quais são identificadas no difratograma pelo ângulo (2θ) ou pela distância interplanar (d) contra a sua intensidade. Estando este padrão relacionado com a composição química e com o ordenamento cristalino das moléculas no cristal (JENKINS; SNYDER, 1996; BRITTAIN, 1999; CUFFINI et al., 2007; SYKULA-ZAJA et al., 2011).

Sua aplicação durante o processo de desenvolvimento de fármacos vai desde os estudos de descoberta até o controle de qualidade dos lotes. Fornecendo informações sobre a estrutura do material seja esta de caráter cristalino ou amorfo (IVANISEVIC, MCCLURG, SCHIELDS, 2010). Portanto, DRX de pós é uma técnica eficaz para a identificação de fármacos sólidos cristalinos (PHADNIS, CAVATUR, SURYANARAYANAN, 1997).

Além disso, essa técnica combina especificidade com um alto nível de exatidão para a caracterização dos fármacos sólidos e é um método especialmente útil para descrever o possível comportamento polimórfico de fármacos. Igualmente permite a identificação simultânea de ingredientes ativos múltiplos em formulações farmacêuticas diferentes (KOUNDOURELLIS et al., 2000).

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) é usada frequentemente para observar o aspecto morfológico, a nível microscópico, de diferentes tipos de componentes, como fármacos e ciclodextrinas, por exemplo (NAIDU et al., 2004; SOARES-SOBRINHO et al., 2012). Dando suporte para o desenvolvimento e a produção de medicamentos (NICHOLS, 2012). Constitui uma ferramenta importante na detecção de mudanças cristalinas em decorrência de variações no processo de síntese ou mesmo do processamento farmacêutico, que podem vir a formar outras formas polimórficas do fármaco (RIBEIRO et al., 2008). Além de se mostrar uma técnica versátil e de fácil interpretação (JOY, 1997).

3.2.4 Análise Térmica

Dentre as técnicas aplicadas na atualidade para caracterização de insumos farmacêuticos, a análise térmica possui vasta aplicação. Trata-se de um conjunto de técnicas que permite avaliar as propriedades físicas de um composto e/ou seus produtos de reação, enquanto este é submetido a um programa controlado de temperatura (MENDONÇA et al., 2014; MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010). As variações propositais nas propriedades físicas dos compostos diante do emprego programado de calor permite a obtenção de diversos parâmetros, que estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto farmacêutico (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Segundo Bernal e colaboradores (2002), os principais pontos analisados são as variações de massa e de entalpia, mensuradas através da Termogravimétrica (TG) e da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), respectivamente. Estas técnicas em associação permitem elucidar uma série de eventos como fusão, ebulição, sublimação, vaporização, dessolvatação, transição de fase sólido-sólido, degradação química, cristalização e decomposição (COSTA, 2010).

A literatura descreve, ainda, que a interpretação destes dados pode evidenciar outras características, tais como a pureza do material analisado (ARAÚJO, 2010; SOARES-SOBRINHO, 2010; COSTA et al., 2013; VIEIRA, et al., 2013), compatibilidade entre duas ou mais substâncias (TIȦ et al., 2008, OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011; COSTA et al., 2013; VIEIRA, et al., 2013), identificação de polimorfismo, estabilidade intrínseca de compostos e/ou formulações e decomposição térmica de fármacos e medicamentos (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). Entretanto, a análise térmica deve ser realizada em associação com técnicas complementares, tais como IV, DRX, MEV, dentre outras, para evitar o estabelecimento de conclusões equivocadas (SOARES, 2011; JÚLIO et al., 2013 ; MELO et al., 2014).

Adicionalmente, a determinação da cinética de degradação também se insere dentre as aplicações de destaque deste conjunto de análises. Esta tem como finalidade principal a determinação dos mecanismos e parâmetros cinéticos das reações de decomposição (energia de ativação, ordem de reação e fator frequência) (TIȦ et al., 2008; SOVIZI, 2010; VIEIRA et al., 2013; MELO et al., 2014), nos quais podem predizer a estabilidade e fornecer informações fundamentais a respeito do tempo e das condições de armazenamento dos fármacos e medicamentos, sendo uma alternativa rápida ou complementar para estimativa do prazo de validade (RODRIGUES et al., 2005; FELIX et al., 2009; SOVIZI, 2010).

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

3.2.4.1 Estudo de compatibilidade por Análise Térmica

O contato entre duas ou mais substâncias está susceptível ao estabelecimento de interações físicas e químicas. Em se tratando de insumos farmacêuticos, uma interação física pode promover alterações nos parâmetros físico-químicos do fármaco, tais como solubilidade, taxa de dissolução e, conseqüentemente, biodisponibilidade. Já numa interação química há modificação da estrutura molecular do fármaco, que irá repercutir na toxicidade do produto (formação de produtos de degradação) ou comprometimento de sua eficácia (perda de potência) (CHADHA; BHANDARI, 2014). Assim, o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente é importante no desenvolvimento de novos medicamentos, pois fornece contribuições importantes para garantir a segurança e eficácia destes produtos (MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010).

O uso de uma técnica rápida, segura e precisa para testar e selecionar os excipientes mais apropriados para o desenvolvimento do produto constitui um avanço significativo na pré-formulação da indústria farmacêutica (JÚLIO et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014). A recente inserção da análise térmica nas etapas iniciais do estudo de pré-formulação tem contribuído significativamente na redução do tempo de desenvolvimento de novas formulações. Para esta aplicação, o DSC é descrito como a técnica mais comumente utilizada, pois é versátil e possui baixo custo, além de permitir análises diretas com amostras de preparo e condições experimentais simples (JÚLIO et al., 2013).

DSC é uma técnica que envolve a aplicação ou retirada de calor de uma amostra, cujo comportamento é comparado ao comportamento de uma substância. Quando esta substância sofre um evento térmico, a diferença entre o fluxo de calor na amostra e na substância referência é contabilizada frente ao tempo ou a temperatura em que ocorreu, sob uma atmosfera específica. Como resultado, tem-se as temperaturas e energias envolvidas nos vários eventos térmicos ocorridos, tais como fusão, temperatura de transição vítrea e cristalização, dentre outros (MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010).

Entretanto, os resultados obtidos por DSC devem ser interpretados cuidadosamente, pois a técnica apresenta resultados inconclusivos (JÚLIO et al., 2013). Frequentemente, após uma triagem realizada por DSC, outras técnicas são aplicadas para, em associação, fornecerem resultados que levem a uma resposta (JÚLIO et al., 2013; COSTA et al., 2013).

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

A interpretação sobre possível incompatibilidade entre substâncias a partir da curva DSC é realizada de modo comparativo, onde dados da substância ativa isolada são comparados com os dados obtidos para substância ativa quando na mistura. Os principais parâmetros avaliados são a aparência, mudança ou desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e/ou variações dos valores de entalpia dos eventos envolvidos (TITA et al., 2011).

Para uma substância cristalina, o foco principal é dado nas características do pico endotérmico referente ao seu evento de fusão, já que a modificação de seus parâmetros e/ou alteração da entalpia está relacionada com alterações nas forças das ligações intermoleculares que sustentam o cristal. Se esta é enfraquecida, é necessário menor quantidade de energia para romper sua estrutura (fusão) (STULZER et al., 2008), o que é prejudicial para sua estabilidade.

Entretanto algumas substâncias farmacêuticas são capazes de antecipar o evento de fusão do fármaco (enfraquecer o cristal) e retardar o processo de degradação do mesmo, como um mecanismo de proteção térmica por parte do excipiente. Este fenômeno foi descrito por Vieira e colaboradores (2013) ao avaliar a compatibilidade entre o protótipo LPSF/GQ-130 e os excipientes PVP K-30, MYRJ 59 e Compritol 888 ATO. Outra particularidade, quando se tratam de polímeros, é a capacidade que estes possuem em realizar interações fortes com o fármaco frente ao aquecimento, onde a liquefação do excipiente leva a solubilização do fármaco, o qual se expressa com a ausência do pico de fusão do fármaco na curva DSC (SALVIO NETO; NOVAK; MATOS, 2009; TIȦ et al., 2010; TIȦ et al., 2011; COSTA et al., 2013). Entretanto, esta alteração na curva não representa necessariamente uma incompatibilidade, mas demonstra a miscibilidade entre os dois componentes.

Neste contexto, a avaliação da compatibilidade entre duas ou mais substâncias deve ter em sua proposta de estudo a análise termogravimétrica onde, a partir dela, é possível mensurar as variações de massa em função da temperatura ou tempo quando esta é submetida a uma programação controlada de calor (TAKAHASHI et al., 2013). Deste modo, a antecipação da temperatura de degradação funciona como mais um indício de incompatibilidade, enquanto que seu retardo afasta esta possibilidade.

3.2.4.2 Determinação da cinética de degradação dinâmica de compostos farmacêuticos

A degradação térmica de substâncias, também denominada termólise, é definida como uma reação química na qual compostos são quebrados em pelo menos duas outras substâncias quando submetidos ao aquecimento. Esta reação é frequentemente expressa através de evento endotérmico, uma vez que requer calor para quebrar as ligações químicas dos compostos sujeitos a decomposição (SOARES-SOBRINHO et al., 2010). Uma vez que a ação do calor funciona como um catalisador para realização dos mecanismos naturais de degradação das substâncias, a obtenção da cinética de decomposição térmica fornece informações importantes sobre a estabilidade destes compostos em temperatura ambiente, seja isolado ou em associação com excipientes.

Assim, a cinética de degradação térmica tornou-se um elemento fundamental na análise térmica, onde o objetivo principal é determinar o mecanismo de reação de decomposição e os parâmetros da equação de Arrhenius, a saber: energia de ativação, fator de frequência e ordem de reação (TIȚA et al., 2008; SOVIZI, 2010; SOVIZI; HOSSEINI, 2013; COSTA et al., 2013). O parâmetro fator frequência ou pré-exponencial (A) fornece uma medida da frequência de ocorrência de uma situação da reação, em geral considerando como um fator intrínseco a frequência de vibração na coordenada de reação. Já a energia de ativação (E_a) é descrita como a barreira energética requerida para converter reagentes em produtos. E por fim, a ordem da reação pode ser definida como a variação da velocidade da reação com a concentração dos reagentes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Os métodos dinâmicos (ou não isotérmicos) de predição de uma taxa de degradação foram desenvolvidos desde 1950 (OLIVA; LLABRÉS; FARIÑA, 2011), onde aquele descrito por Ozawa, feito por aproximação linear, é muito empregado (RODANTE et al., 2001; RODANTE; CATALANI; VECCHIO, 2002; CIDES et al., 2006). Neste método, a razão de aquecimento é utilizada como uma variável para obtenção de cada uma das curvas TG, devendo-se submeter as amostras a pelo menos quatro razões de aquecimento constantes que, por aproximação linear baseada em cálculos integrais a partir da equação de Arrhenius (Equação 1), permite determinar os parâmetros cinéticos (OZAWA, 1965; CHENG et al., 2001; RODANTE et al., 2001; RODANTE; CATALANI; VECCHIO, 2002; CIDES et al., 2006; FELIX et al., 2009).

$$K(T) = Ae^{\frac{-Ea}{RT}} \quad \begin{matrix} \text{(Equação 1)} \\ \text{(Equação 1)} \end{matrix}$$

Legenda: “A” representa o fator frequência ou termo pré-exponencial, “Ea” a energia de ativação, “R” a constante geral dos gases (8,31 J.mol⁻¹.K⁻¹) e “T” a temperatura absoluta (K).

Dentre os parâmetros obtidos através desta abordagem, a Ea é o de maior interesse para avaliar a estabilidade de compostos farmacêuticos (VECCHIO et al., 2001; NETO, 2013), podendo ser utilizada para o estabelecimento de um perfil comparativo de estabilidade entre vários fármacos e suas associações, onde quanto maior a Ea, maior a estabilidade térmica do composto (SOVISI et al., 2010). Esta comparação tem sido realizada por diversos autores na literatura, a exemplo de Felix e colaboradores (2009) e Costa e colaboradores (2013), dentre muitos outros.

3.2.5 Determinação do pKa

As propriedades físico-químicas dos fármacos interferem diretamente nos parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e na interação com o receptor (BARREIRO; FRAGA, 2008). Entre essas propriedades, estão a lipofilicidade e a ionização, que influenciam na sua absorção e consequentemente em sua biodisponibilidade (PEREIRA et al., 2011). Os fármacos geralmente se apresentam como ácidos ou bases fracas nas soluções estando estes nas formas não-ionizadas (moleculares) ou ionizadas (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Desta forma, os valores de pKa refletem o grau de ionização das moléculas em diferentes valores de pH e corresponde ao valor de pH no qual 50% das moléculas encontram-se na sua forma ionizadas e 50% na molecular, quando em solução. O conhecimento deste parâmetro é essencial para a estimativa de propriedades farmacocinéticas, dado que a absorção e a distribuição são altamente afetadas pela ionização do composto. Isso acontece devido à diferente solubilidade e lipofilicidade das formas ionizadas (mais solúvel em meios aquosos) e neutras das moléculas (menos solúvel em meios aquosos) (VÖLGYI et al., 2007).

3.3 CICLODEXTRINAS COMO ALTERNATIVA PARA O INCREMENTO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FÁRMACOS

O uso de fontes biodegradáveis para o desenvolvimento de novas matérias-primas tem despertado bastante interesse em diferentes setores. Podem ser utilizados em embalagens de fabricação, materiais descartáveis e até mesmo na preparação de micro e nanocápsulas para a liberação controlada de fármacos. Os biopolímeros inovadores tem cada vez mais atingido lugar de destaque no cenário mundial, onde após muitos anos de pesquisa e desenvolvimento, este grupo de materiais tem tido um sucesso crescente no mercado, principalmente devido ao menor custo, à preservação dos recursos limitados, à proteção do ambiente e clima, bem como ao resultado dos impostos para a eliminação e reciclagem (DEORSOLA et al., 2014).

Neste contexto estão inseridas as ciclodextrinas (CD's), oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glucose ligadas por unidades α (1-4). Sua produção é decorrente da degradação do amido pela ação da enzima glicosiltransferase (CGT), presente em alguns microorganismos (LYRA et al., 2010; FREITAS et al., 2012; LIU et al., 2014).

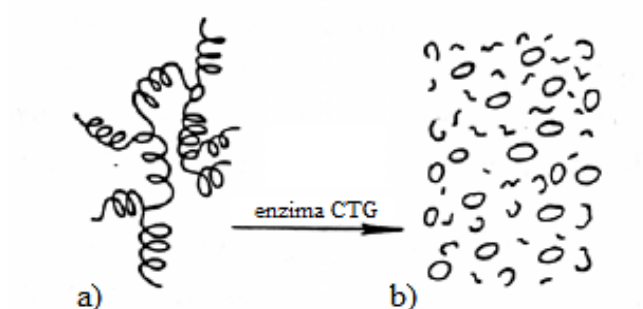
Uma das propriedades mais importantes deste grupo de moléculas é a sua capacidade para formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hóspedes (compostos inorgânicos ou orgânicos de natureza neutra ou iônica) em solução (SINGH et al., 2010 ; SOARES-SOBRINHO et al., 2011). Podendo ser utilizadas em um vasto ramo de atuação (cosméticos, alimentos, na indústria farmacêutica, entre outros) (DEORSOLA et al., 2014).

As CDs têm sido particularmente exploradas por desempenhar um papel crucial no que diz respeito à liberação controlada de fármacos. Os sistemas de entrega de fármacos (*Drug Delivery System*), oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (FERREIRA; ROCHA; SILVA 2009). Na indústria farmacêutica, CDs são utilizadas principalmente para melhorar a estabilidade e solubilidade de princípio ativo (PA) e suas propriedades organolépticas, como o sabor e odor em formulações farmacêuticas. Podendo também ser utilizadas para mascarar o cheiro e sabor desagradáveis de alguns fármacos, líquidos de processo em compostos sólidos bem como reduzir a sua volatilidade (GUEDES et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2011; RUZ et al., 2012; XU et al., 2014).

3.3.1 Histórico e conceito das ciclodextrinas

A descoberta das primeiras CD's data de aproximadamente 117 anos atrás, quando o cientista A. Villiers, em 1891, relatou em seus estudos ter isolado e identificado uma substância cristalina chamada "cellulosine", a partir da degradação bacteriana de amido, sendo este o primeiro caso descrito na literatura, Figura 3 (VILLIERS, 1891; GUEDES et al., 2008; DEORSOLA et al., 2014).

Figura 3 - Formação de dextrinas cíclicas e acíclicas a partir do amido. a) amido b) dextrinas cíclicas e acíclicas.



Fonte: Saenger, 1980.

Franz Schardinger, em 1903, publicou um artigo no qual ele descreve ter isolado duas substâncias cristalinas, a partir da degradação do amido de batata, originalmente chamadas de "dextrinas cristalinas" e, posteriormente, as nomeou de ciclodextrina α e β , sendo a do tipo γ isolada apenas em 1935 (Del VALLE, 2004). Este estudo teve como base as várias linhagens de bactérias que sobrevivem ao processo de cozimento, estudadas por terem sido ditas como responsáveis por alguns casos de intoxicação alimentar. Schardinger descobrira então, que uma dessas bactérias "termófilas", denominadas de tensão II, resistente ao calor, foi capaz de dissolver o amido e formar polissacarídeos cristalinos (dextrina).

A partir de então, foram desenvolvidos vários sistemas de fracionamento para a produção de CDs. Porém as suas estruturas ainda não tinham sido confirmadas (STELLA, RAJEWSKI 1997; MABUCHI, NGOA 2001), até que em 1942 as moléculas de α e β CD tiveram seu perfil

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

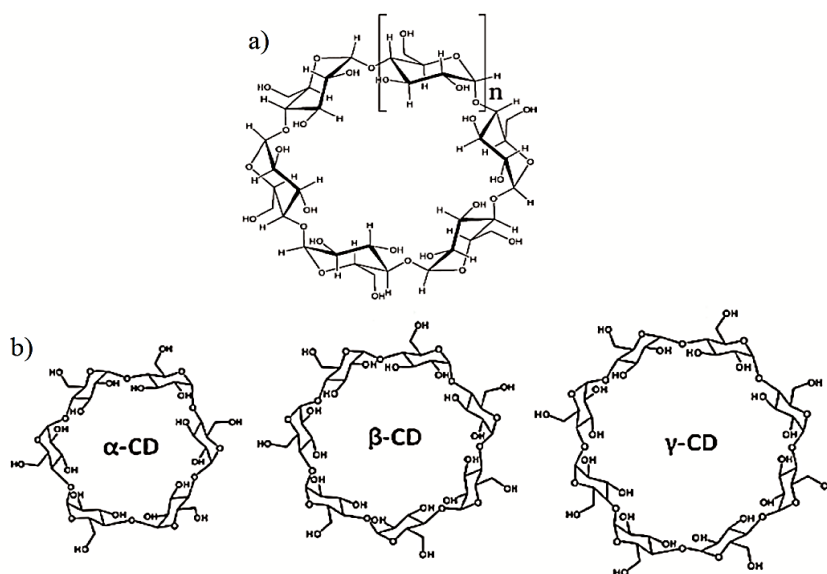
cristalino conhecido por DRX. Quatro anos mais tarde foi possível a elucidação, também por esta técnica, da γ CD (Del VALLE, 2004).

3.3.2 Características das Ciclodextrinas.

Devido ao impedimento estérico, não é possível a obtenção de CD's com menos de seis unidades de glucose (UG) em sua estrutura e apesar de já ter sido relatado à existência de CD's com mais de oito UG (nove, dez, onze e doze, denominadas respectivamente, de δ , ϵ , ζ , η e θ CD) estes homólogos são pouco utilizados devido ao difícil e, conseqüentemente, oneroso, processo de purificação (CHALLA et al., 2005; SINGH et al., 2010).

Esta informação corrobora com os dados presentes na literatura, que relatam que as CDs mais comuns e com maior rendimento são as do tipo α -ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) e γ -ciclodextrina (γ CD), também chamadas de ciclodextrinas naturais, sendo estas formadas por 6, 7 e 8 UG, respectivamente (figura 4) e (tabela 1) (GUEDES et al., 2008; RASHEED et al., 2008; LAZAROWSKA; JÓZEFOWICZ; HELDT, 2012; LIU et al., 2014; LOUIZ et al., 2015).

Figura 4 - a) Estrutura molecular geral das CDs. O radical n representa o local de adição das unidades de glicose, formando assim os diferentes tipos de CDs. b) estrutura das ciclodextrinas naturais.



Fonte: adaptado de a) Britto et al. (2004); b) Ferreira, Rocha e Silva (2009).

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

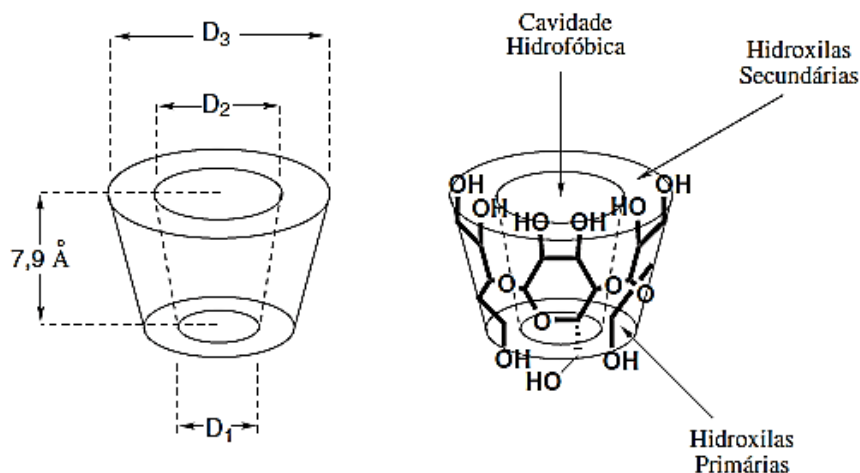
Tabela 1 - Características físico-químicas das ciclodextrinas naturais.

Propriedades Físico-químicas	α	B	Γ
Nº de unidades de glucopirranose	6	7	8
Peso Molecular	972	1135	1297
Diâmetro da cavidade central (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Solubilidade em água a 25°C (g/100mL)	14.5	1.85	23.2
pKa (25°C)	12.33	12.20	12.08

Fonte: Adaptado de Singh et al (2010).

No estado natural as CDs são moléculas rígidas, cristalinas e homogêneas, que oferecem inúmeras utilidades em função do seu tamanho, forma e grupos funcionais livres (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). A partir da elucidação de sua estrutura tridimensional foi possível comprovar que as CDs se apresentam na forma espacial cônica, cuja superfície externa apresenta características hidrofílicas, devido à posição ocupada pelas hidroxilas primárias unidas ao átomo de carbono C6 e as hidroxilas secundárias ligadas aos átomos de carbonos C2 e C3 (figura 5). No entanto, o posicionamento do oxigênio das ligações glicosídicas e dos hidrogênios das unidades de glicosídicas, estando estes, voltados para a parte interna da estrutura, faz com que as CDs tenham uma cavidade interna de caráter hidrofóbico (Del VALLE, 2004; PIRES, 2011). Propriedades esta que torna estes açúcares capazes então de encapsular em seu interior moléculas lipofílicas, aumentando assim a solubilidade em água, a estabilidade e biodisponibilidade de fármacos (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; ALEEM et al., 2008; YANG et al. 2013; ZHANG et al 2013a).

Figura 5 - representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas.



Fonte: Ferreira; Rocha e Silva (2009).

3.3.3. Ciclodextrinas naturais X Ciclodextrinas modificadas

Entre os três tipos de ciclodextrinas naturais, a de maior destaque é a β CD, pois esta apresenta uma maior eficiência na complexação de fármacos (ZHANG et al., 2010) e relativa facilidade de síntese e produção em larga escala, sendo este processo mais simples e financeiramente mais atrativo (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

Utilizada para fins farmacêuticos, estendendo a sua aplicação em diferentes campos de atuação, como por exemplo: nas eletroanalises (CHEN et al., 2011), na biotecnologia (YANG et al., 2009), na proteção de ambientes (ZHANG et al., 2012), bem como em produtos alimentares (HU et al., 2012a ; HU et al., 2012b). Neste ultimo, Hicks e colaboradores (1996) já relatava a utilização da β -CD para inibir o processo de escurecimento enzimático de sucos de pêra, maçã e uva branca. Kollengode e Hanna (1997), buscavam a estabilização de compostos aromáticos presentes no café que se apresentam quimicamente instáveis e com alta volatilidade, sendo vantajosa a complexação com a β -CD visto ao aumento da estabilidade térmica destes compostos.

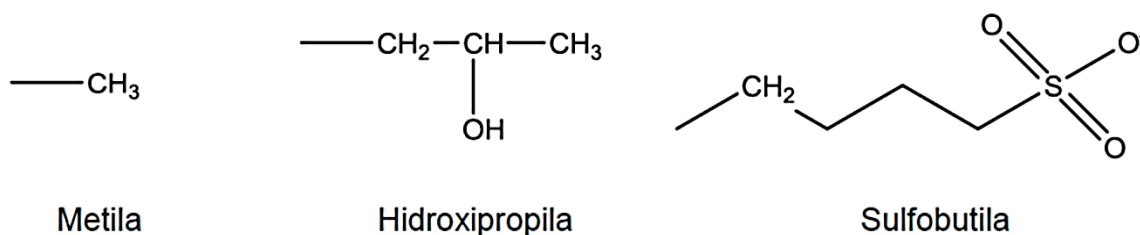
Apesar da sua vasta aplicação, a β -CD apresenta uma baixa solubilidade em água (aproximadamente 2%) (DAVIS; BREWSTER, 2004; QIU et al., 2014). Adicionalmente, em determinadas concentrações, esta apresenta uma grande afinidade com colesterol podendo carrear-lo da membrana lipídica de células e, em concentrações suficientemente altas, pode causar hemólise dos eritrócitos (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999). Sua administração parenteral não é

possível devido a sua baixa lipofilicidade, que a faz precipitar como microcristais nos rins, além do fato de formar complexos com o colesterol que se acumulam e danificam os néfrons (FERREIRA; ROCHA; SILVA 2009; LUKE et al., 2010; XU et al., 2014).

Devido a estes efeitos adversos, o uso farmacêutico das ciclodextrinas naturais vem sendo gradativamente substituído pelos seus derivados semi-sintéticos (GUEDES et al., 2008) levando também a busca de derivados mais solúveis e relativamente mais seguros, que ofereçam maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais (DE MELO et al., 2008).

Estes derivados, mais conhecidos como ciclodextrinas modificadas, podem ser sintetizadas a partir da α , β e γ CD através da substituição dos hidrogênios das hidroxilas ligadas ao carbono 6 por grupos hidroxipropila, metila e sulfobutila principalmente (figura 6) (PIRES, 2011). Loftsson e Duchene (2007) citaram que substituições de qualquer grupamento OH por moléculas hidrofóbicas tais como grupos metoxi resultam em drástico aumento de sua solubilidade aquosa.

Figura 6 - Substituintes de maior destaque, utilizados nas substituições dos hidrogênios presentes nas hidroxilas das CDs.



Fonte: Pires, 2011.

Posteriormente tornaram-se disponíveis CDs com derivados hidroxipropil e sulfobutyleter. Outros autores relatam aumento da solubilidade aquosa de furosemida com compostos derivados de β CD, tais como HP β CD e SB β CD. Esses derivados apresentam aumento na segurança e nas propriedades de solubilidade comparadas a β CD (SPAMER et al., 2002; ROGÉRIO et al., 2010).

A HP β CD é largamente utilizada como agente complexante (RUAN et al., 2008), devido a sua expressiva solubilidade aquosa (ZHANG et al., 2013b), em torno de 60% superior a do tipo beta (QIU et al., 2014). Sendo esta a primeira CD a ser aprovada pela FDA (FRANZINI, 2011). É bem tolerada em seres humanos, mostrando uma baixa toxicidade por via oral, não sendo

visualizada assim a toxicidade renal e atividade hemolítica vista com a β CD (LIU et al., 2006; MA et al., 2012; ZOELLER et al., 2012). Além disso, tem sido utilizada para sistemas de liberação de fármacos oftálmicos. Estudos *in vitro* e em *in vivo* mostram que CIs de droga com baixa solubilidade aquosa, utilizando esta CD, aumentam a solubilidade, estabilidade, permeabilidade da córnea refletindo na sua maior biodisponibilidade oftálmica (BOZKIR; DENLI; BASARAN, 2012; ZHANG et al 2013a).

Juntamente a HP β CD pode-se destacar a SB β CD, uma excelente modificação da β CD que também apresenta uma ótima solubilidade em água com baixa toxicidade (LIU et al., 2014; XU et al., 2014). Das varias derivações das CDs naturais, estes dois tipos são as de maiores interesses farmacêuticos, sendo largamente aplicados (FRANZINI 2010; PIRES 2011; RASHEED et al., 2008).

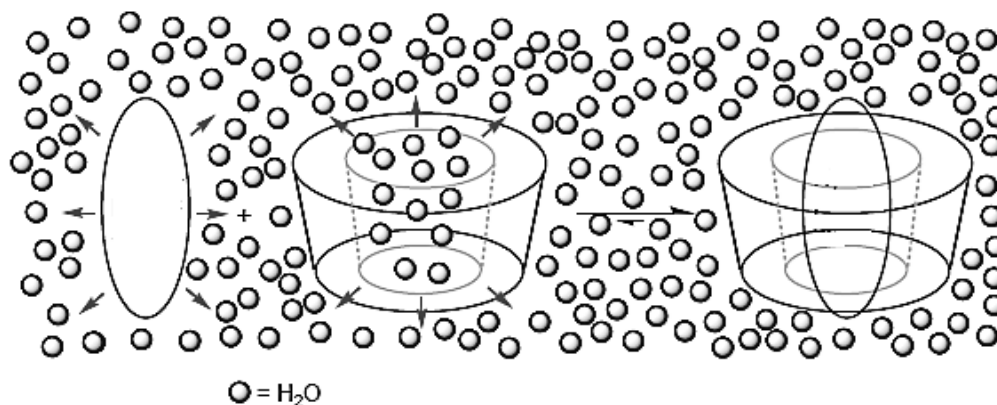
3.3.4 Formação de complexos de inclusão.

A presença da cavidade interna hidrofóbica das CDs faz com que elas tenham a capacidade de alojar uma molécula hóspede formando complexos ou compostos de inclusão com uma variedade de substâncias hidrofóbicas (Del VALLE, 2004).

Para a formação de complexos com CDs é necessario que a molécula hóspede entre em contato com a cavidade da CD para que seja formada uma associação estável (LIRA, 2007). A inclusão do fármaco nesta cavidade baseia-se nos princípios da química supramolecular, na qual a interação entre os dois componentes em um arranjo organizado é feita por forças intermoleculares fracas, tipo Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas (DUCHÊNE et al., 1990; SAENGER, 1980; PAULA et al., 2005).

Quando em solução aquosa de CD, as moléculas de água preenchem a cavidade da CD, estando em um estado energeticamente menos favorável são substituídas por moléculas do fármaco (figura 7). Desta forma a cavidade central da CD atua como uma molécula “hospedeira”, podendo alojar em seu interior uma molécula “hóspede” total ou parcialmente (BUDAL 2003; ASTRAY et al., 2009)

Figura 7 - representação esquemática da formação de complexos de inclusão entre a molécula hóspede e a CD



Fonte: Adaptado de Astray et al., 2009.

Quando o CI é administrado, independente da via escolhida, ocorre dissociação deste complexo com consequente liberação da molécula hóspede. Se estabelece assim um equilíbrio dinâmico entre as formas livres da CD, do fármaco e do CI. A liberação depende da quantidade de líquido que circunda o complexo, e se dá pelo processo de diluição deste ou pelo deslocamento competitivo com substâncias lipofílicas, endógenas no organismo, e que possuam maior afinidade com a cavidade (LOFTSSON; DUCHENE, 2007). Ocorrendo a dissociação, o fármaco encontra-se na forma livre e apto para que seja absorvido e distribuído pelo organismo, uma vez que complexado ele não conseguiria atravessar as membranas devido à característica hidrofílica da CD, o que justifica a sua baixa toxicidade.

Material e métodos

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 PARTE 1 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA

4.1.1 MATERIAL

A epiisopiloturina foi extraída e isolada pela indústria Anidro do Brasil Extrações S. A., situada em Parnaíba (PI), conforme metodologia descrita por Veras e colaboradores (2013).

4.1.2 MÉTODO

4.1.2.1 Identificação por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de seloneto de zinco. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR em triplicata. Foram obtidas com varreduras de 650 a 4000 cm^{-1} de resolução de 4 cm^{-1} .

4.1.2.2 Determinação do pKa

O pKa experimental da EPI foi realizado no equipamento Sirius T3® com auxílio do software SiriusT3Control, aplicando-se o procedimento chamado de Fast UVpKaÒ previamente desenvolvido com base no método de titulação espectrofotométrica (UVmetricÒ) já relatado na literatura (TAM; TAKÁCS-NOVÁK, 2001) e que teve sua confiabilidade comprovada em estudos anteriores (SIRIUS ANALYTICAL INSTRUMENTS, 1995; TAM; TAKÁCS-NOVÁK, 2001; BOX et al., 2003). Uma solução 100 mM do protótipo foi preparada em DMSO. Em seguida, 5 μL dessa solução foram retirados e 25 μL de uma solução tampão denominada de Sirius Neutral Linear UVÒ foram adicionados para facilitar a estabilização do pH da solução após cada titulação. Executaram-se três titulações da mesma amostra, sempre do menor pH para o maior, cobrindo uma faixa de pH entre 2 e 12. Como agentes titulantes, foram utilizados o HCl e KOH 0,5 M. As

titulações foram executadas em água ultra-purificada. Os espectros de absorção no UV da solução foram monitorados continuamente na amostra a cada titulação por uma sonda de fibra óptica de imersão, realizando-se, desta forma, uma varredura da amostra entre 118 e 1100 nm para construir um gráfico absorvância versus pH e, deste modo, determinar o pKa do protótipo. Os dados coletados foram analisados através do software SiriusT3Refine[®] e apenas os dados obtidos entre 250 e 275 nm foram incluídos na análise. O número de valores de pKa foram obtidos com auxílio da análise do Target Factor Analysis[®] (TFA), um recurso matemático do programa. A temperatura em 25°C e uma atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹ foi mantida durante todo experimento. Os níveis de CO₂ também foram monitorados durante todo o experimento para que não interferissem com os resultados. O experimento foi realizado em triplicata.

4.1.2.3 Difração de Raios-X

Os difratogramas do protótipo foram obtidos no difratômetro SIEMENS[®] (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2 θ (graus) de 5-60 a uma velocidade de digitalização de 0,02°. As amostras foram analisadas em triplicata em suportes de vidro com uma fina camada de material do pó sem solvente.

4.1.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para esta análise, a amostra foi montada em fita dupla-face de carbono, e metalizada com ouro por 15 minutos. Realizada em microscópio FEI[®], modelo Quanta 200F, com 200kV de voltagem de aceleração, baixo vácuo (0.5torr), emissor FEG e elétrons secundários como modo de aquisição de imagem.

4.1.2.5 Análise Térmica

A caracterização térmica da EPI foi realizada a partir de termobalança Shimadzu®, modelo DTG-60H, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e faixa de aquecimento de 25 a 600°C. Para este método foi utilizado massa das amostras de 3 mg ($\pm 0,3$), acondicionadas em porta-amostra de alumínio. Antes dos ensaios verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado com perdas de massa definidas. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS® (Thermal Analysis) versão 2.20 da Shimadzu®.

O estudo cinético não-isotérmico foi realizado conforme método de Ozawa (1965), com aquecimento das amostras no intervalo de 30° a 600°C, e razões de aquecimento de 2,5; 5; 10; 20 e 40°C.min⁻¹. Para o tratamento dos dados, foi utilizado o modelo proposto por Ozawa (1965), conforme programa de análise cinética desenvolvido pela Shimadzu®. O coeficiente angular (slope) do gráfico que correlaciona log A vs 1/T (K⁻¹) fornece a Ea do processo. Os valores do fator frequência (A) e ordem de reação também são obtidos neste estudo cinético, a partir do gráfico que correlaciona a massa residual da amostra pelo tempo reduzido em minutos (OZAWA, 2000; RODANTE; CATALANI; VECCHIO, 2002; CIDES et al., 2006).

As curvas DSC para a Epiisopiloturina e todas as misturas físicas foram obtidas por meio de uma calorímetro da marca Shimadzu®, modelo DSC-60, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras analisadas de 3mg ($\pm 0,2$) acondicionadas em porta-amostras de alumínio hermeticamente fechados. As curvas DSC para caracterização térmica do protótipo foram obtidas, respectivamente, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, até a temperatura de 300°C, em triplicata. Antes dos ensaios realizou-se calibração do DSC via ponto de fusão do Índio (156,6 $\pm 0,3$ °C) e Zinco (419,6°C $\pm 0,3$). O fluxo de calor e entalpia foram calibrados via ponto de fusão do Índio (18,59 J.g⁻¹ $\pm 0,3$), sob as mesmas condições das amostras. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS® (Therma Analysis) versão 2.20 da Shimadzu®.

4.1.2.6 Otimização do método de quantificação da epiisopiloturina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foram realizadas algumas alterações no método de partida desenvolvido por Avancini e colaboradores (2003), visto os problemas apresentados em sua reprodução. Diante disto, alguns parâmetros foram avaliados, sendo eles: temperatura do forno, volume de injeção da amostra, proporção de metanol na fase móvel (FM) e variação do pH da FM.

Nesta etapa, fez-se uso dos seguintes reagentes: ácido fosfórico (Merck®), Trietilamina (Dinâmica®), hidróxido de sódio (Acros organics®), ácido fórmico (Merck®), fosfato de potássio monobásico (Dinâmica®) e de Metanol grau HPLC (J.T. Baker®). A água utilizada foi ultrapurificada pelo equipamento MilliQ Millipore® (Milli-Q® System, Massachusetts, USA). As vidrarias volumétricas (Satelit®) foram calibradas, segundo certificado de calibração emitido pelo fabricante.

Os equipamentos utilizados no estudo foram: Balança Analítica Bioprecisa®, modelo FA2104N; Ultra-som 1.500 Barnson® (70 W potência); e Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE-DAD) modelo DGU-20 A5, Shimadzu®.

A condição inicialmente tratada, descrita por Avancini e colaboradores (2003), tinha como FM a proporção 90:10 (V/V) de fase aquosa (FA) e Metanol, respectivamente, sendo esta FA preparada a partir da adição de 3 mL de Trietilamina e 13,5mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) em 1 litro de água ultrapurificada. Esta FA era então neutralizada com uma solução de NaOH a 0,2M até atingir o pH 3,0.

As demais condições descritas por este método de partida incluíam: fluxo de 1mL/min, forno mantido à temperatura ambiente e volume de injeção das amostras de 20µL. A coluna utilizada como fase estacionária foi uma coluna C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm) Supelco®.

Alteração da fase móvel (FM): substituição do ácido fosfórico por ácido fórmico

Dada a não reprodutibilidade do método proposto por Avancini e colaboradores (2003) e visto as vantagens com relação a utilização do ácido fórmico frente ao ácido fosfórico previamente descrita por Fiorucci, Soares e Cavalheiro (2015), foi realizada a substituição deste componente

visando a obtenção de uma solução final de mesmo pH 3. Baseado nestes aspectos, foi estabelecido como procedimento para a elaboração desta fase aquosa a adição do mesmo volume de Trietilamina (3 mL) no volume total de água ultrapurificada (1000 mL) e, em seguida, a adição de ácido fórmico até alcance do pH 3,0, ao qual foi atingido após adição de 3mL do ácido fórmico.

Determinação dos demais parâmetros do método de quantificação

Realizada a alteração supracitada em um dos componentes da FM, outros parâmetros analíticos foram analisados com vistas a otimização do método de quantificação. Quanto à temperatura do forno, esta foi modificada para 30 °C; os volumes de injeção analisados foram de 20 e 60 µL; o percentual da FA e de metanol (fase orgânica) na FM foram variados entre 90:10 e 60:40 (V/V); e, por fim, o pH da FM foi testado em pH 3,0 e 5,0 por meio de modificações no volume de ácido fórmico adicionado na fase aquosa. A escolha destes parâmetros levou em consideração a área do pico da EPI e o seu tempo de retenção.

Preparo das amostras

As amostras de EPI foram preparadas utilizando como solvente o meio de dissolução a ser testado na parte 3 deste trabalho: tampão pH 6,8 (USP, 2011). Foram feitas três soluções-mãe (triplicata) visando a obtenção de uma solução final na concentração de 40 µg/mL. Para garantir a total solubilidade da EPI, as amostras foram levadas ao ultrassom por 15 minutos, até completa solubilização. Em seguida foram filtradas em filtro Millipore® e acondicionadas em vials.

4.1.2.7 Avaliação do perfil de dissolução da epiisopiloturina

Para a determinação do perfil de dissolução do protótipo o meio de dissolução escolhido foi o tampão pH 6,8 preparado segundo descrição da USP (2011): 6,805 g de fosfato de potássio monobásico e 0,0896 g de NaOH, sendo o volume completado para 1 L de água destilada.

4.1.2.8 Preparo das amostras

O perfil de dissolução da EPI foi obtido em quadruplicata. As amostras foram pesadas com o equivalente a 0,1% da concentração de saturação da EPI no meio aplicado, visando respeitar a condição *sink* e a oferta de amostra.

4.1.2.9 Condições empregadas na dissolução

O teste foi realizado utilizando em cada cuba um volume de 250 mL do meio (pH 6,8), a 50 RPM de rotação, com o aparato II da USP (aparato pá). Os pontos de coleta foram 5, 15, 30, 60 e 90 min. Para cada ponto da curva foi retirada alíquotas de 3 mL do meio de dissolução, com o auxílio de uma seringa, com posterior reposição do volume de meio de dissolução. A altura da coleta das amostras foi fixada conforme especificado no método geral de dissolução da Farmacopéia Brasileira (5 ed, 2010). Ao final, as amostras obtidas foram filtradas em membranas filtrantes millipore® com abertura do poro de 22 µm, e transferidas diretamente para vials. Para quantificação por CLAE utilizando o método otimizado.

Para fins de comparação entre os perfis de dissolução obtidos foi calculada a Eficiência de Dissolução (ED%) dos mesmos, conforme Equação 2 (KHAN, 1975):

$$ED\% = A_s \times 100 / A_t \quad (\text{Equação 2})$$

Onde “As” representa a área sombreada e “At” representa a área total do retângulo. Os valores da área sob a curva (ASC) e área total foram calculados no software OringPro®.

4.2 PARTE 2 - ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FRENTE A EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

4.2.1 MATERIAL

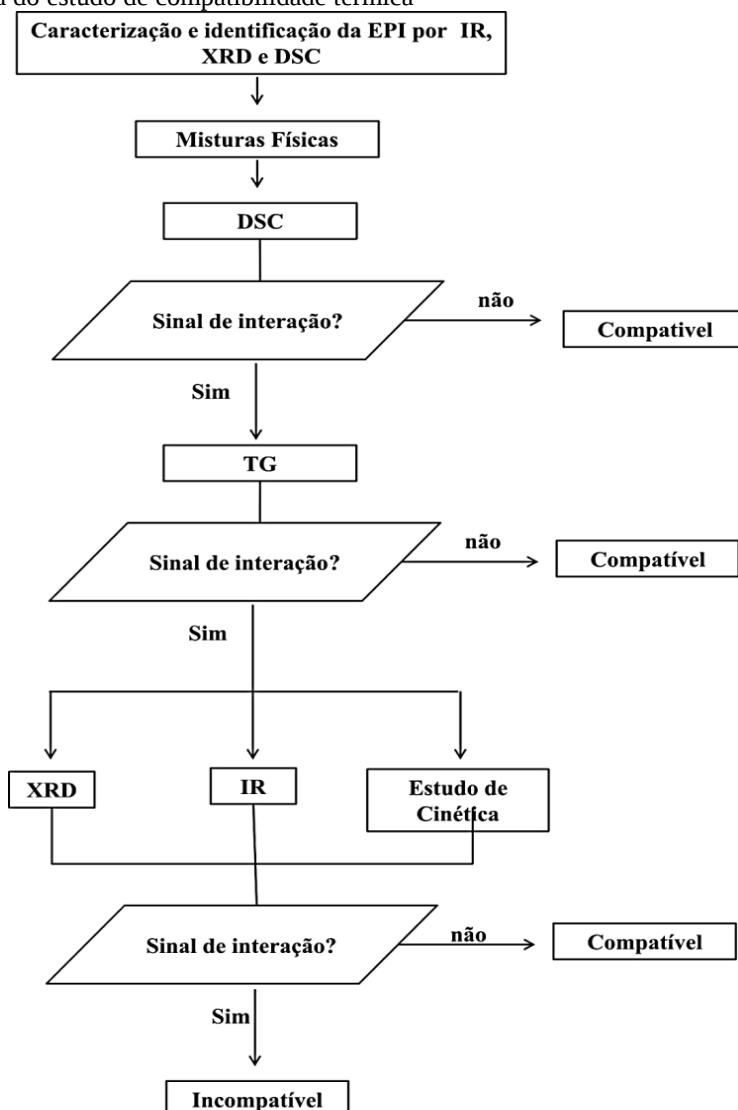
Foram testados alguns excipientes importantes para a obtenção de uma forma farmacêutica sólida, sendo eles: lactose monohidratada (Pharma Nostra[®]), Amido (Colorcon[®]), Celulose Microcristalina (Blanver Farmoquímica Ltda[®]); Polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) (Xiamem[®]) e Hidroxipropil metil celulose (HPMC).

4.2.2. Obtenção das Misturas Físicas

As misturas físicas (MF) foram obtidas a partir de trituração dos compostos durante 1 minuto, com o auxílio de grau e pistilo. A proporção 1:1 (p/p) foi empregada para maximizar as interações entre os compostos, uma vez que os excipientes estarão em proporções menores em uma formulação farmacêutica (SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

4.2.3 Estudo de Compatibilidade Protótipo-Excipiente

O fluxograma (Figura 8) apresenta o procedimento utilizado para avaliação da estabilidade térmica da EPI frente a excipientes farmacêuticos. Inicialmente, foram comparadas as curvas DSC do protótipo isolado (massa = 3 mg $\pm$ 0,3) e das misturas físicas EPI:excipiente (1:1) (massa = 6 mg $\pm$ 0,3), a partir da avaliação dos parâmetros envolvidos no evento de fusão do protótipo. Em caso de sinal de interação, foram obtidas as curvas TG com o objetivo de comparar o evento de degradação do protótipo isolado e em mistura. Nas amostras em que o sinal de interação persistiu, realizaram-se as análises de DRX e IV, na tentativa de explicar a fundamentação destes sinais de interação. Por fim, em caso de resultados inconclusivos, foi calculada a cinética de degradação não-isotérmica, na intenção de comparar a energia de ativação envolvida neste processo para o fármaco isolado e em mistura.

Figura 8 – Fluxograma do estudo de compatibilidade térmica

Fonte: produção própria

Os ensaios referentes à elucidação das interações (cinética de degradação, IR e DRX) seguem a mesma metodologia aplicada na caracterização da matéria-prima, mencionados na parte 1 (material e métodos) deste trabalho.

4.3 PARTE 3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO A BASE DE EPIISOPILOTURINA

4.3.1 Obtenção dos complexos de inclusão e misturas-física

Os complexos de inclusão (CI's) e as misturas-físicas (MF's) foram obtidos respeitando a proporção equimolar (EPI:CD). De acordo com o peso molecular das ciclodextrinas utilizadas e da EPI, tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade equimolar de CD's utilizadas na formação de complexos de inclusão (CI) com a EPI.

Ciclodextrinas	Peso Molecular
Bcd	1113,4g/mol
HP β CD	1500g/mol
SB β CD	2120g/mol
Epiisopiloturina	286g/mol

Fonte: produção própria.

Os CI's foram preparados a partir da obtenção de MF's entre o protótipo e a CD correspondente com o auxílio do grau e pistilo, sendo trituradas por um minuto. A estas MFs foi adicionada quantidade suficiente de água destilada, sob agitação constante por 3 horas, seguida de sonicação por 15 minutos, onde foi possível visualizar a total solubilização dos dois componentes presentes em cada associação, formando para os três casos uma solução completamente límpida e transparente.

As soluções obtidas foram então mantidas em ultrafreezer a temperatura média de -80°C por 48 horas, até total congelamento das amostras e, em seguida, as mesmas foram submetidas ao processo de liofilização, uma das técnicas empregadas na obtenção de CI. Após 48 horas, as amostras foram retiradas do liofilizador, armazenadas em frasco âmbar e mantidas em dessecador.

4.3.2 Caracterização físico-química dos complexos de inclusão obtidos

Os produtos obtidos foram caracterizados através de técnicas físico-químicas, visto a sua importância na avaliação da eficiência da complexação (FREITAS et al., 2012). As técnicas escolhidas foram as mesmas utilizadas na parte 1 do trabalho, sendo elas: DRX, IV, Análise térmica (TG e DSC) e a determinação do perfil de dissolução dos três CIs formados.

4.3.2.1 Avaliação do perfil de dissolução da epiisopiloturina versus complexos de inclusão

A partir da obtenção do perfil de dissolução do protótipo, parte 1 deste trabalho, foi possível realizar além do estudo comparativo entre a taxa de dissolução da EPI frente aos CIs obtidos com a β CD, SB β CD e HP β CD, analisar qual o tipo de CD se mostrou mais eficiente para o incremento da sua solubilidade.

As amostras analisadas e as condições empregadas para o teste de dissolução dos CIs e suas respectivas MFs foram obtidos nas mesmas condições descritas na parte 1 do trabalho.

Resultados e discussão

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE 1 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA

5.1.1 Aspecto macroscópico da EPI

A EPI se apresenta na forma de um pó fino, branco (figura 9) e inodoro.

Figura 9 - Aspecto Macroscopico da EPI.



Fonte: produção própria

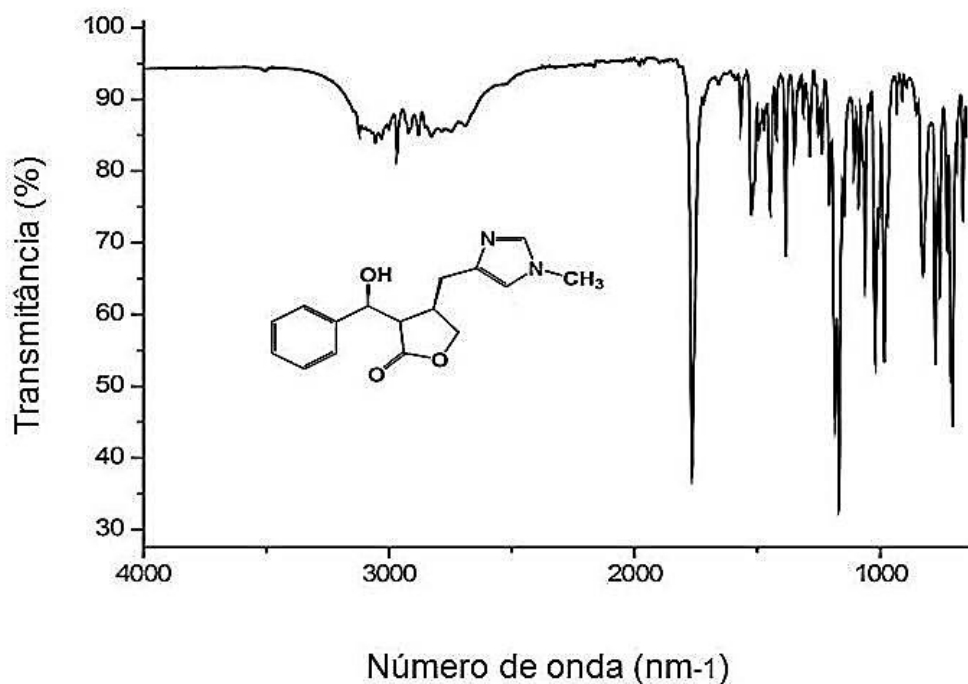
5.1.2 Identificação por Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho

A análise de espectrometria por IV permite a identificação dos principais grupos funcionais presentes em uma molécula a partir das vibrações características de cada grupo. De acordo com o espectro de IV (Figura 10) é possível identificar uma banda de alta intensidade em 1766 cm^{-1} atribuído a $\text{C}=\text{O}$ do anel lactônico. A banda bem definida em 1385 cm^{-1} é referente à forma vibracional do grupo álcool secundário ligado à molécula orgânica. A β -lactona é identificada pela banda em 1184 cm^{-1} , em 775 cm^{-1} o C-H fora de fase do benzeno. O grupamento N-C-N

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

pode ser visualizada pela presença da banda em 1524 cm^{-1} e em 1587 cm^{-1} tem-se a banda referente a ligação C-C no benzeno. As bandas apresentadas confirmam a identidade química da molécula, conforme Vêras e colaboradores (2013).

Figura 10 - Espectro de absorção na região do infravermelho da Epiisopiloturina



Fonte: produção própria

5.1.3 Determinação do pKa

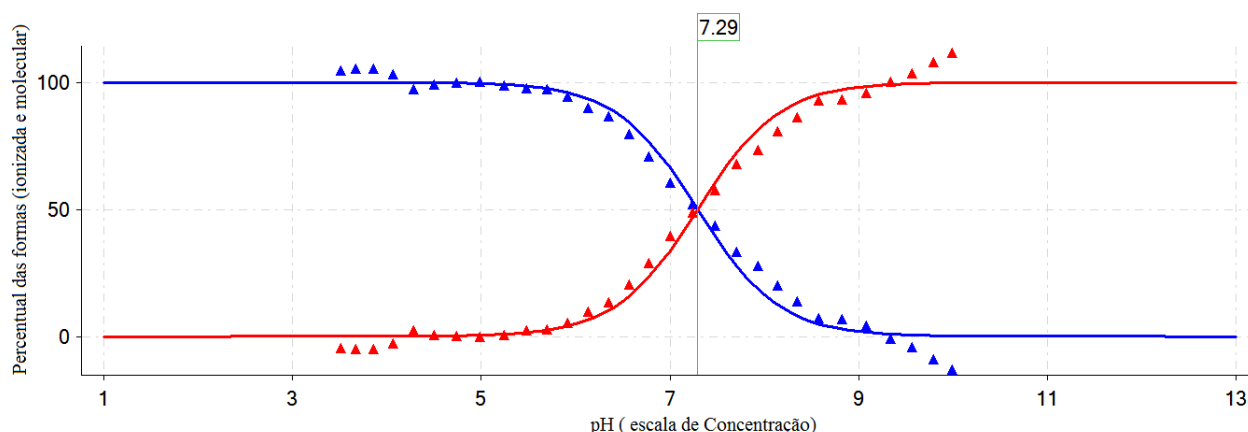
A determinação experimental do pKa através do equipamento Sirius T3[®] faz uso de uma solução tampão denominada de “sirius neutral linear UV”, que possui absorbância em comprimento de onda inferior a 240 nm (BOX et al., 2003). Assim, o comprimento de onda convencional para leituras da EPI (216 nm) (VERAS et al., 2013) não pode ser aplicado. Como a maioria dos alcalóides, EPI apresenta outro ponto de absorbância máxima em seu espectro em 255 nm. Apesar de este comprimento de onda apresentar o inconveniente de um coeficiente de extinção molar muito pequeno, foi possível adquirir resultados confiáveis, em triplicata.

O estudo experimental mostrou apenas a formação de uma espécie em meio líquido, denominada B⁺. O equilíbrio em percentual de presença entre as duas espécies ocorre no pH 7,29 (figura 11), que é por definição o pKa da molécula. Assim, pode-se afirmar que neste valor de pH

50% das moléculas estão na sua forma ionizada e 50% estão na sua forma molecular. A forma iônica é prevalente em pH ácido, podendo-se concluir que a EPI é uma base fraca, como já esperado em virtude dos próprios grupamentos químicos da molécula.

Uma vez que o caminho percorrido por um fármaco administrado por via oral enfrenta o pH estomacal (1–1,2), duodenal (4,4–4,8) e intestinal (6,8–7,0), é factível que EPI se encontrará, em sua maioria, na sua forma ionizada no corpo. Além disso, a solubilidade da molécula tende a ser maior em pH ácido, de modo que, ao se aproximar do pH do duodeno, a precipitação do protótipo não é improvável. Assim, o estudo do pKa permitiu a compreensão de que EPI apresenta dois problemas em potencial: a permeabilidade, pois a depender do mecanismo de permeação da substância o fato de ela se encontrar na forma ionizada pode ser prejudicial; e a solubilidade, pois a queda brusca de solubilidade entre o pH estomacal e intestinal pode levar a precipitação da substância no intestino, e assim ser excretada.

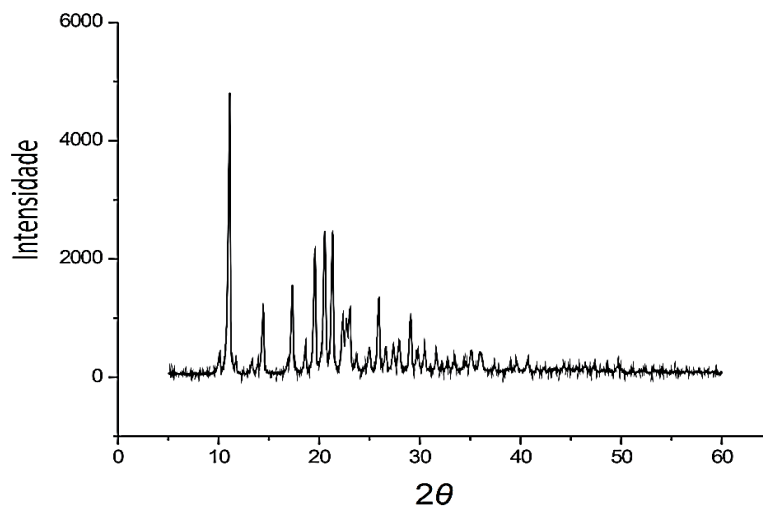
Figura 11 - Distribuição das espécies: ionizada e molecular, no valor de pKa estabelecido a partir do equipamento Sirius T3®.



5.1.4 Difração de Raios-X

De acordo com o difratograma (Figura 12), a EPI apresenta vários picos bem definidos, dos quais são principais aqueles expressos em: 11,1; 19,58; 20,56; 21,32; característicos de material cristalino.

Figura 12 - Difratoograma da EPI

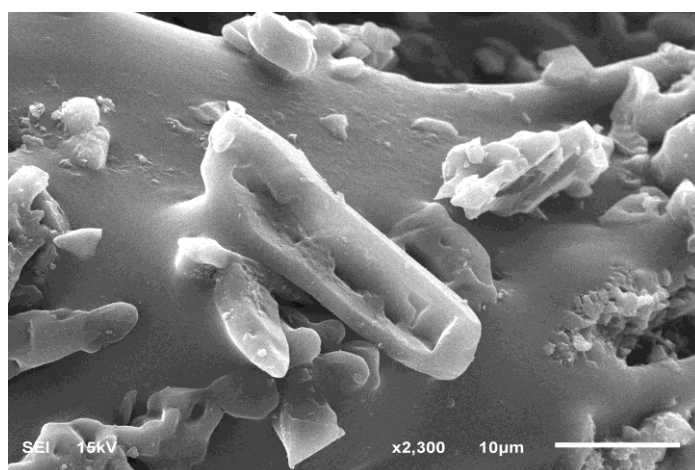


Fonte: produção própria

5.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A partir da MEV (figura 13), foi possível observar a morfologia dos cristais da EPI, que se apresentam na forma de cristais irregulares. O perfil cristalino observado corrobora com o resultado obtido pelo DRX.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura da EPI, sob aumento de 2.300 vezes.



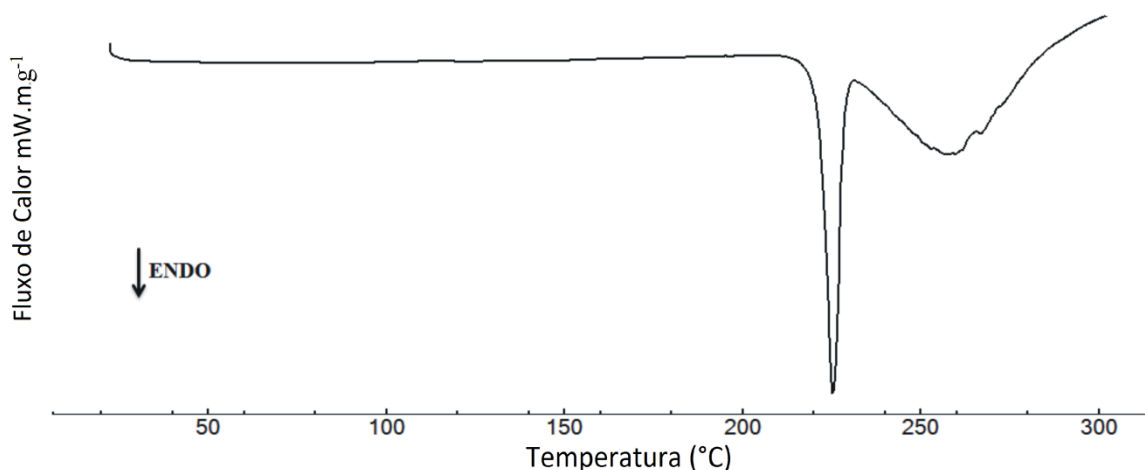
Fonte: produção própria

5.1.6 Análise Térmica

5.1.6.1 Calorimetria exploratória diferencial

O perfil térmico dos cristais de EPI foi determinado a partir do somatório de informações obtidas através das curvas DSC e TG/DTG. Assim, o pico endotérmico agudo evidenciado na curva DSC (Figura 14), com faixa de fusão de 221,72 a 228,24°C ($\Delta E = -148,75 \text{ J.g}^{-1}$), em concordância com os estudos anteriores realizados por Veras e colaboradores (2013).

Figura 14 – Curva DSC da EPI, sob razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min^{-1} .

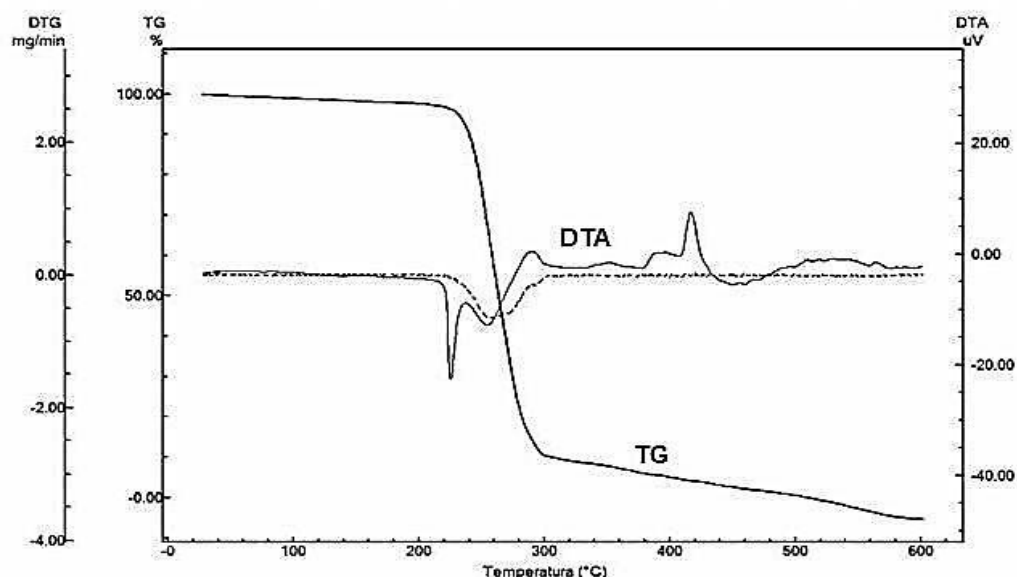


Fonte: produção própria

5.1.6.2 Termogravimetria

Adicionalmente, as curvas TG/DTG, figura 15, obtidas demonstram que a degradação do protótipo se inicia em aproximadamente 224 °C, com perda de massa (Δm) de 79,27%, logo após o pico referente ao evento de fusão da EPI, evidenciado no DSC. Deste modo, pode-se identificar a faixa de temperatura na qual o protótipo apresenta-se termicamente estável.

Figura 15 - Curva TG, DTG e DTA da EPI, sob razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$.

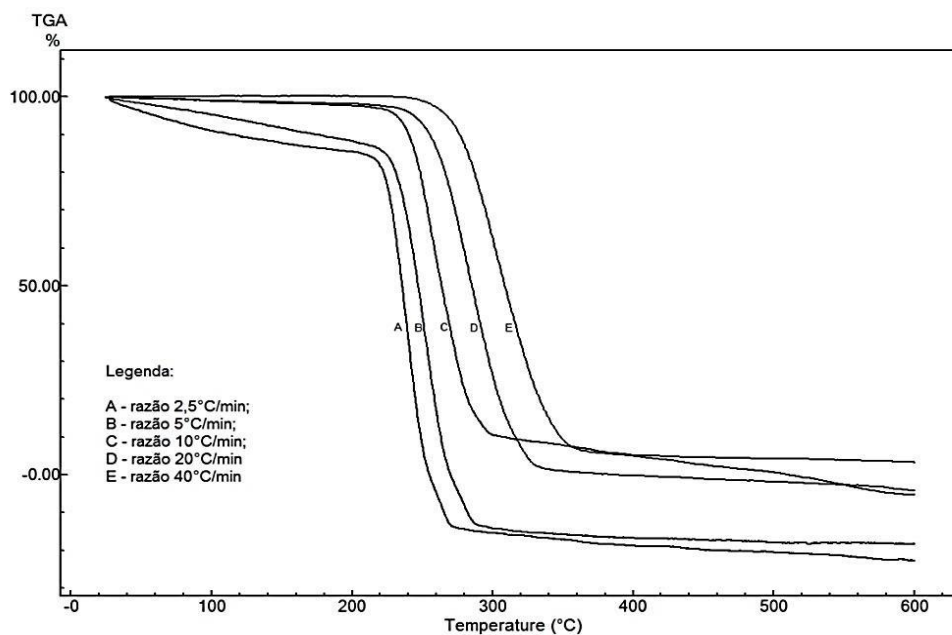


Fonte: produção própria.

Uma vez que as curvas TG apresentaram variação de massa, foi possível calcular a cinética de degradação térmica não isotérmica da EPI aplicando-se o modelo de Ozawa (BROWN, 2001; TIȚA et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2010). Vieira e colaboradores (2013) destacam a importância do conhecimento a cerca das propriedades de decomposição térmica de fármacos e excipientes, pois, este compreende um dos requisitos para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, uma vez que determinam parâmetros de grande interesse para avaliação de sua estabilidade.

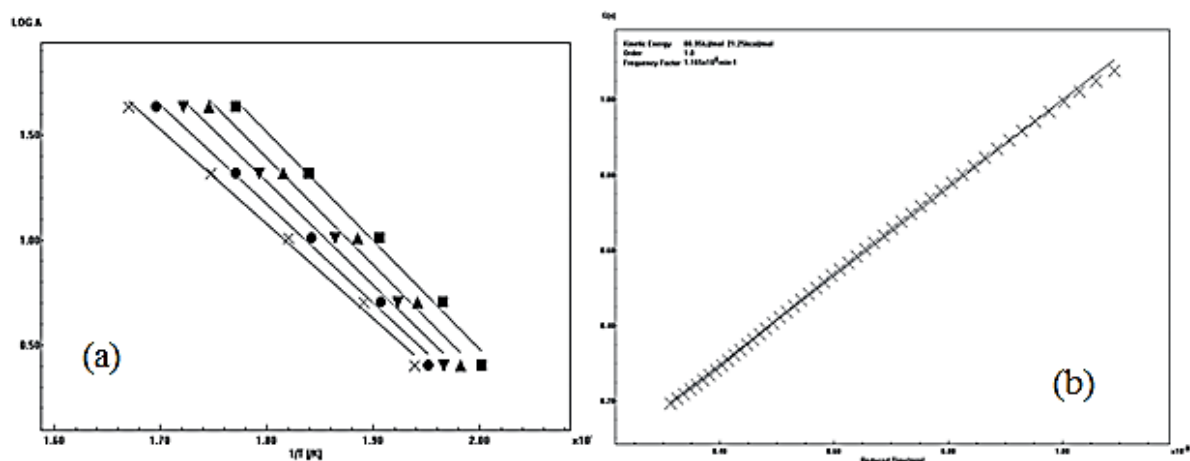
A partir dos ensaios da análise cinética obtiveram-se as curvas TG (Figura 16) que proporcionaram a correlação de $\log A \times 10^{-4}$ (Figura 17a), a partir do modelo proposto por Ozawa em 1965. Assim, foi possível a obtenção do gráfico $G(x)$ x tempo reduzido (min) (Figura 17b), onde através deste foram calculados os parâmetros cinéticos: energia de ativação (E_a) de $88,95\text{ kJ}.\text{mol}^{-1}$ e fator frequência (A) de $1,165 \times 10^8\text{ min}^{-1}$. A ordem de reação foi estimada de acordo com a linearidade da reta obtida para o gráfico $G(x)$ versus o tempo reduzido (Tabela 3), o que demonstrou ser uma reação de primeira ordem. Segundo Florence e Attwood (2011), uma reação de primeira ordem é assim caracterizada quando a velocidade da reação é dependente da concentração do substrato.

Figura 16 - Curvas TG da EPI nas diferentes razões de aquecimentos (2,5; 5; 10; 20 e 40° C), sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹



Fonte: produção própria

Figura 17 - a) Gráfico log A vs. K⁻¹; b) Gráfico da função G(x) vs. Inverso da temperatura de EPI



Fonte: produção própria

Tabela 3 - Linearidade das diferentes ordens de reação da cinética de degradação da EPI

Ordem da reação		Parâmetros					r^2
0	G(x)	0,14	0,28	0,44	0,56	0,65	0,9728
	TR	0,26	0,4	0,59	0,78	1	
1 ^a	G(x)	0,17	0,32	0,58	0,81	1,02	0,9961
	TR	0,26	0,4	0,59	0,78	1	
2 ^a	G(x)	0,18	0,35	0,78	1,26	1,87	0,9878
	TR	0,26	0,4	0,59	0,78	1	

Fonte: produção própria

5.1.7. Perfil de dissolução da epiisopiloturina

A dissolução pode ser definida como o processo pelo qual o principio ativo é liberado, quando em sua forma farmacêutica, torna-se disponível para ser absorvido pelo organismo. Em função disso, os estudos de dissolução *in vitro* tornaram-se fundamentais para o desenvolvimento e otimização de novas formulações sólidas orais. Dessa forma, a velocidade pela qual o processo de dissolução ocorre determinará a liberação do fármaco e a sua absorção (BANAKAR, 1992; MANADAS et al., 2002; NERY et al., 2007).

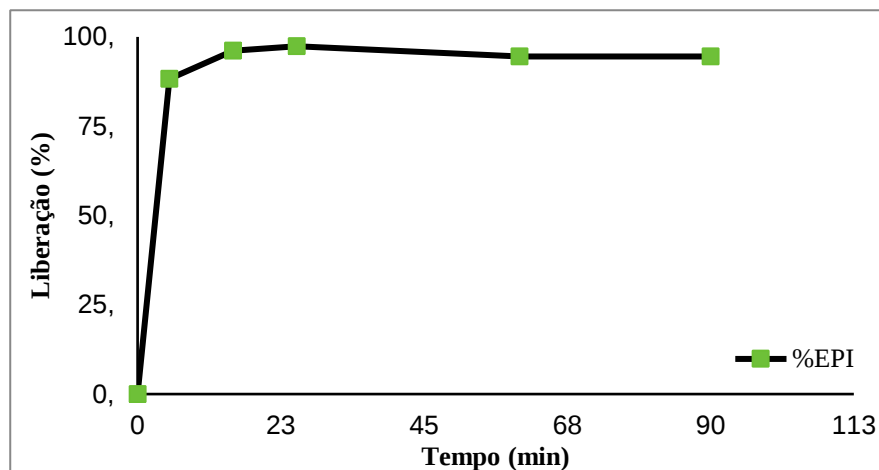
No caso de novas moléculas, torna-se importante avaliar o impacto de fatores que interferem em sua dissolução, realizando testes *in vitro* que permitam visualizar o seu comportamento em do tempo a fim de diminuir os possíveis problemas que esta possa apresentar em relação à biodisponibilidade (ARANCIBIA et al., 1992).

A avaliação do perfil de dissolução em diferentes meios na faixa de pH fisiológico é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo* - *in vitro* (FDA, 1997; LIMA et al 2009). Nesse estudo, o perfil de dissolução da EPI foi determinado em dois valores de pH (1,2 e 6,8) a fim de verificar a influência deste no processo de dissolução do protótipo.

A partir dos resultados obtidos, em pH ácido foi possível visualizar uma taxa de dissolução de 88,24% da EPI nos primeiros 5 minutos (Figura 18), e de 97,34% em 15 minutos, seguido da

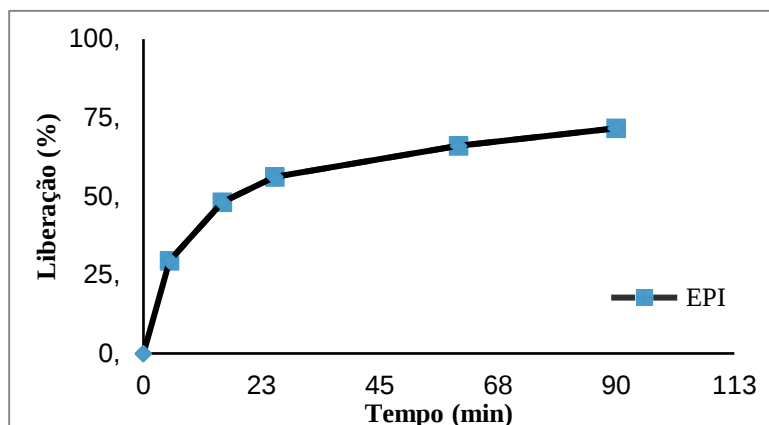
formação de um platô na curva. A FDA (*Food and Drug Administration*) relaciona este tipo de perfil, em ensaios de dissolução em meio ácido, para drogas que se comportam como solução, quando mostram uma taxa de dissolução de pelo menos 85% em 15 minutos, e por isso, não devem apresentar quaisquer tipo de problemas de biodisponibilidade.

Figura 18 - Perfil de dissolução da EPI em pH 1,2.



Fonte: produção própria.

Já em pH 6,8 (Figura 19), a EPI mostrou um comportamento diferente, podendo-se visualizar uma reta ainda crescente, apresentando um ponto máximo apenas no último tempo de coleta (90 minutos) no qual foi observado um percentual de 84,11%. Desta forma o seu perfil de dissolução em pH básico se mostrou mais lento, sendo dissolvido apenas 39% aproximadamente, nos primeiros 5 minutos. Assim, pode-se pressupor que a EPI, embora solúvel em pH 1,2, possa sofrer recristalização ao alcançar o duodeno e o intestino, ou até mesmo, com a mudança brusca de pH, pode haver uma precipitação do protótipo.

Figura 19- Perfil de dissolução em meio pH 6,8.

Fonte: produção própria.

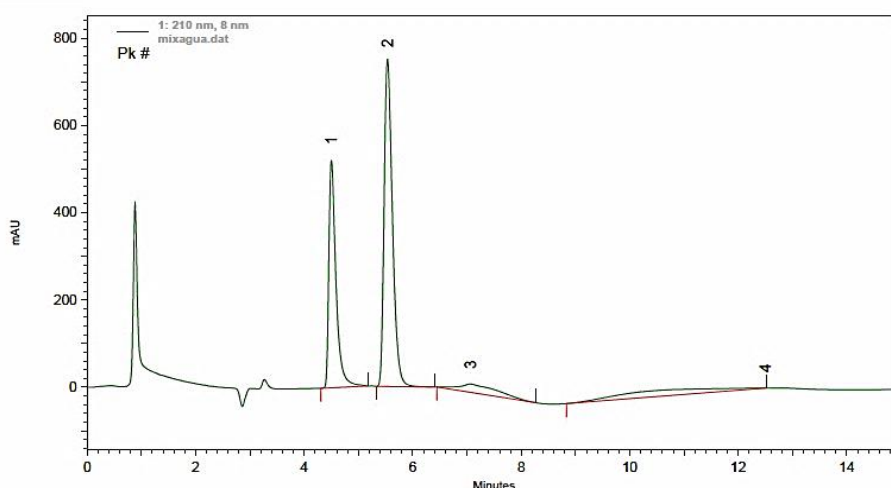
Gonsales e colaboradores (2013), através de análises para extração ácido-base do propranolol e da nimesulida a partir de comprimidos comprovaram que a solubilidade do propranolol em meio aquoso ácido deve-se à presença da amina secundária na molécula, a qual atua como uma base fraca de Brönsted-Lowry. Após a protonação da amina forma-se o sal de amina quaternária que permite a formação de interações intermoleculares do tipo íon-dipolo entre esta substância e a água, além das ligações de hidrogênio. São todas estas interações atuando conjuntamente que permitem a solubilização do fármaco em meio aquoso ácido. No processo de extração, a alcalinização do meio desprotona a amina quaternária fazendo com que as interações íon-dipolo deixem de existir, reduzindo a solubilidade do propranolol em água, que consequentemente precipita como molécula neutra. Estas informações podem ser atribuídas a EPI, visto a presença de grupos receptores de hidrôgenio, passíveis a protonação.

5.1.8. Otimização de método de quantificação da epiisopiloturina por CLAE

Na tentativa de utilizar uma técnica mais simples para a quantificação da EPI, em ensaios preliminares fez-se uso de um espectrofotômetro UV/VIS. Porém, no andamento das análises não foi possível à quantificação do protótipo por este método, visto o comprimento de onda que o mesmo é absorvido (216nm). Esta região apresenta muitos interferentes que impossibilitaram a obtenção dos valores de absorbância do protótipo. Desta forma, viu-se a necessidade de dosear a EPI através de uma técnica mais sensível, sendo então escolhido o CLAE-DAD.

A literatura traz para quantificação de alcalóides por CLAE o método proposto por Avancini e colaboradores (2003), onde o mesmo foi utilizado para quantificação da EPI em estudos já publicados por Barnabé (2009). Neste último, foi realizada uma análise comparativa entre a quantificação da pilocarpina e epiisopiloturina extraídas por uma nova metodologia utilizando fluidos supercríticos. A partir destes resultados, o método se mostrou eficaz nas condições usadas para identificação dos dois componentes e a EPI apresentou um tempo de retenção de 5,5 minutos (figura 20). Entretanto, em nossas condições laboratoriais, o método não se apresentou reproduzível para quantificação, além de ter provocado entupimento sucessivos no equipamento devido provavelmente a reação entre o ácido fosfórico e o metanol, presentes na FM.

Figura 20 - Cromatograma da mistura de padrões de pilocarpina (pico 1) e de epiisopiloturina (pico 2), diluídas em água.



Fonte: Barnabé (2009).

Além deste, Veras e colaboradores (2013) aplicaram outra metodologia para a quantificação do protótipo, onde o mesmo apresentou um tempo de retenção em 50 min, tornando-o pouco prático e econômico. Por se tratar de um protótipo e a literatura apresentar apenas estes dois métodos já utilizados para a sua quantificação, foi preferível recorrer ao proposto por Avancini e colaboradores (2003), sendo assim necessária a realização de algumas adaptações visando a sua otimização e a melhor qualidade das medidas realizadas.

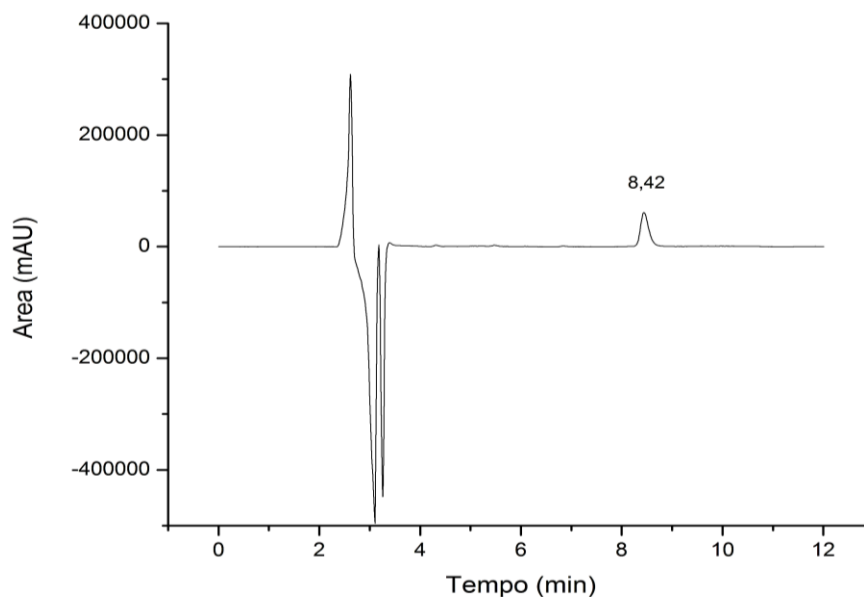
5.1.8.1 Alteração da fase móvel (FM): substituição do ácido fosfórico por ácido fórmico

O método inicial apresenta como constituintes da FM a associação do ácido fosfórico e trietilamina (presentes na fase aquosa), além do metanol (fase orgânica). O ácido fosfórico é reconhecido como um ácido fraco ($K_a = 7,6 \times 10^{-3}$) e, associado a trietilamina, formam uma solução tampão capaz de ajustar o pH da FM para garantir a manutenção da amostra em solução.

Em levantamento bibliográfico sobre a identificação e separação dos alcaloides presentes no jaborandi por meio de técnicas de HPLC-ESI-MS/MS, foi visto que o ácido fórmico é utilizado com bons resultados como constituinte da FM (ABREU et al., 2007; SAWAYA et al., 2011). Assim, estes trabalhos nortearam uma possível substituição do ácido fosfórico pelo ácido fórmico na tentativa de averiguar o não entupimento do sistema, já que o ácido fórmico também é um ácido fraco ($K_a = 2,05 \times 10^{-4}$), mas que sua base conjugada entra em equilíbrio prótico quando dissociada, evitando assim a formação de precipitados (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2015).

A alteração realizada se mostrou eficaz, sendo possível observar na figura 21 o pico característico da EPI em 8,42 min e sem a ocorrência de entupimentos. Por se tratar de uma molécula pouco conhecida, ainda não se tem informações a respeito da sua estabilidade e, consequentemente, dos possíveis produtos de degradação formados em condições de estresse. Desta forma, este trata-se também de um ensaio inicial, que servirá como base para o futuro desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, uma vez que oferece o tempo de retenção da EPI em uma margem confiável.

Figura 21 – Cromatograma obtido após alteração da fase móvel. EPI apresentando um tempo de retenção de 8,42 min, fluxo da fase móvel de 1mL/min, com volume de injeção de 20µL



Fonte: produção própria.

5.1.8.2 Determinação dos demais parâmetros do método de quantificação

Os dois métodos de quantificação da EPI utilizados como base nesta etapa do trabalho utilizavam a temperatura ambiente para execução do experimento. Uma vez que o método não se apresentou reprodutível, optou-se não só pela modificação na fase móvel supracitada, como também pelo ajuste na temperatura do forno, que passou a ser de 30 °C a fim de evitar fontes de erro.

A fim de garantir medidas mais seguras, optou-se também por aumentar o volume de injeção das amostras de 20 µL para 60 µL. Na tabela 4 é possível observar o aumento na área do pico, fator este facilmente explicado pelo maior volume injetado da amostra. Pode-se destacar o valor de pratos teóricos superior para a amostra de 60µL/mL. Este parâmetro está diretamente relacionado à eficiência da coluna. Então, quanto maior o número de pratos teóricos, maior a eficiência da coluna e consequentemente, haverá uma melhor desempenho na separação dos picos (LANÇAS, F.M, 2009).

Adicionalmente, o tempo de retenção da EPI foi antecipado para 3,47 min. provavelmente em virtude do aumento da temperatura do forno então utilizado (30 °C). Desta forma, estas alterações mostraram ser vantajosas na quantificação do protótipo, uma vez que um dos grandes

desafios para a quantificação de fármacos em amostras derivadas de estudo de liberação *in vitro* consiste em reduzir o tempo de análise, devido à elevada quantidade de amostras a serem avaliadas, além de torná-lo mais rápido e economicamente viável (VELLOSO et al., 2009).

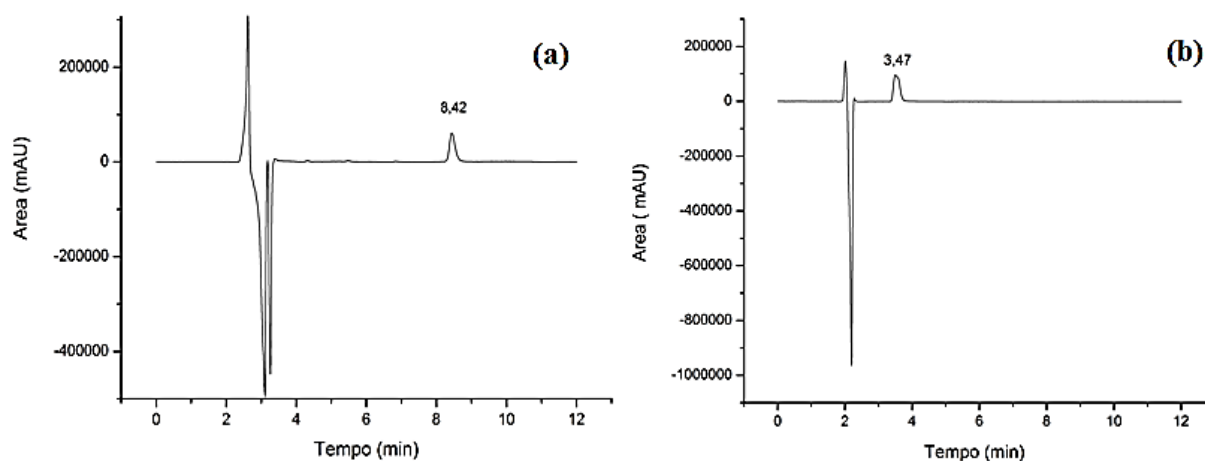
Levando-se em consideração as respostas desejadas, relacionadas à área do pico e tempo de retenção da EPI, esta alteração se mostrou eficaz, pois foi possível diminuir o tempo de análise, com a melhora da resposta.

Tabela 4 – Dados cromatográficos para a EPI frente a modificação na temperatura do forno e volume de injeção

	Área	Nº de Pratos teóricos	Fator de Cauda	Tempo de Retenção (min.)
20µL/mL	1006142	1356.417	1.408	8.42
60µL/mL	1352600	1811.104	1.560	3.47

Fonte: produção própria.

Figura 22 - Cromatográficos para a EPI frente à modificação na temperatura do forno e volume de injeção

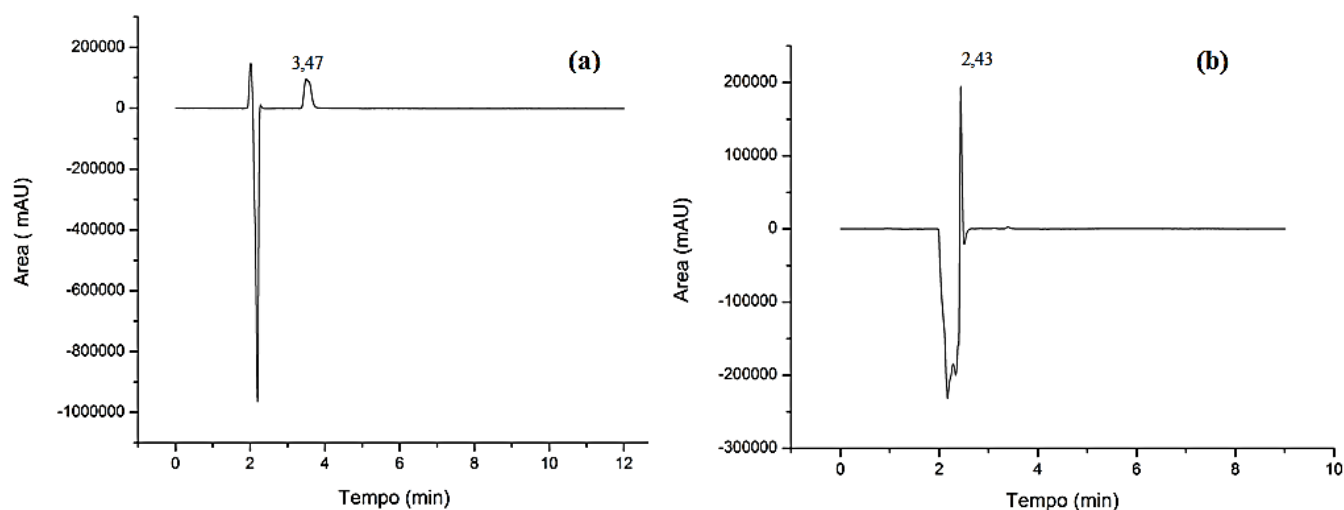


Fonte: produção própria

A composição da FM tem influência significativa na performance cromatográfica e na separação das substâncias presentes na solução a ser analisada (FB 5, 2010). Portanto, partindo do

pressuposto de que a EPI apresenta baixa solubilidade em água (GUIMARÃES et al., 2013), viu-se a importância de avaliar o seu comportamento frente a uma maior proporção de fase orgânica (MeOH). Sendo assim, foram testadas as proporções 90:10 e 60:40 de FA:MeOH (v/v) (figura 23a e 23b). Nesta avaliação foi possível perceber que quanto maior a proporção de metanol, menos favoráveis são os parâmetros área e fator de cauda (Tabela 5). Além disso, neste último, a redução do seu tempo de retenção não se mostrou interessante ao método, pois no tempo 2,43 min, o pico da EPI se encontra no volume morto, região onde é possível verificar picos referentes à FM, sofrendo assim muitas interferências.

Figura 23 - Cromatogramas da EPI nas proporções de FM (a) 90:10 e (b) 60:40 (fase aquosa:MeOH).



Fonte: produção própria

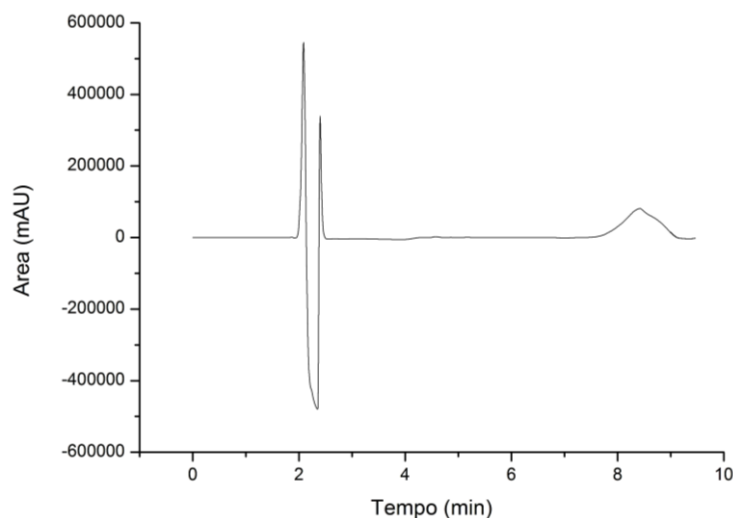
Tabela 5 - Dados cromatográficos para a EPI frente à variação quanto à proporção de fase orgânica na FM.

	Area	Nº de Pratos teóricos	Fator de Cauda	Tempo de Retenção (min.)
90:10	1352600	1811.104	1.560	3.47
60:40	969600	1098.010	1.604	2.43

Fonte: produção própria

O equipamento utilizado na execução destes experimentos apresenta como limite mínimo um pH de FM igual a 3,0. Neste contexto, avaliou-se também a real interferência do pH na quantificação da EPI, uma vez que valores mais altos poderiam ser menos prejudiciais ao equipamento. Assim, foram testados os pHs para fase aquosa da FM de 3,0 e 5,0. Nas análises realizadas em pH 5,0 (figura 24) fica visível o significativo alargamento do pico da EPI, uma característica indesejável para a cromatografia líquida, que ocorreu provavelmente em virtude da menor solubilidade da EPI na FM com o aumento do pH desta, o que favorece a maior interação do protótipo com a fase estacionária, causando o alargamento do pico visualizado.

Figura 24 – Cromatograma da EPI frente à mudança de pH da FM para 5,0.



Fonte: produção própria.

Todas as quantificações avaliadas neste tópico foram realizadas em triplicada, sendo os valores obtidos correspondentes à média das três determinações.

Com base em todas as alterações testadas e avaliadas, o método de escolha para a quantificação da EPI nas etapas seguintes deste trabalho terão os seguintes parâmetros: FM na proporção 90:10 (V/V), em pH 3, com um volume de injeção da amostra de 60µL e temperatura do forno estabelecida em 30°C. Sendo estas as melhores condições encontradas para a quantificação da EPI, levando em consideração as respostas consideradas (área do pico e tempo de retenção).

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

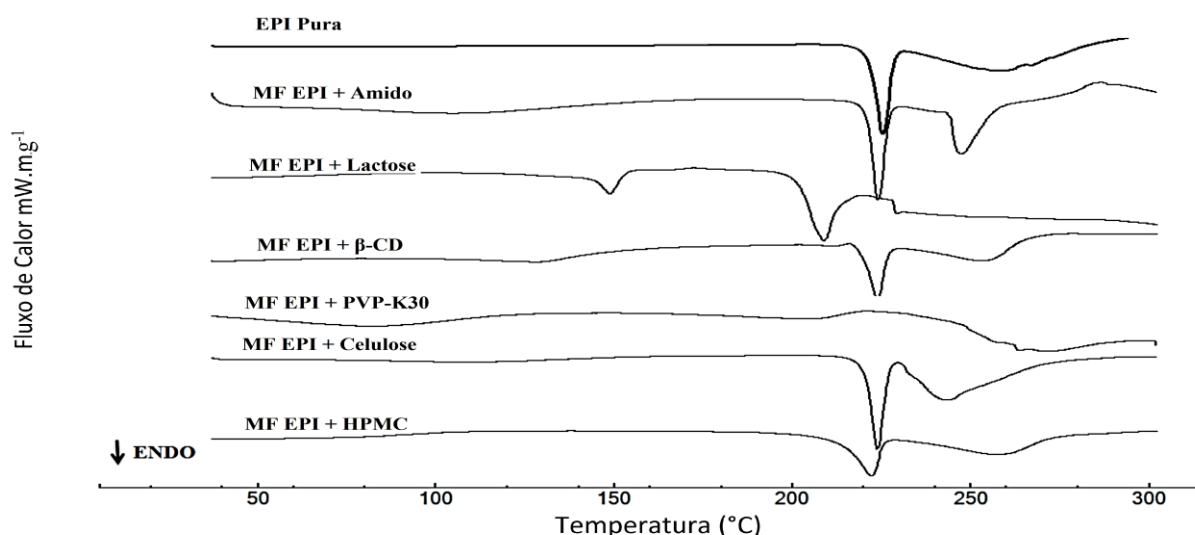
5.2 PARTE 2 - ESTUDO DE COMPATIBILIDADE TÉRMICA FRENTE AOS EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

5.2.1 Estudo de Compatibilidade Protótipo-Excipiente

5.2.1.1 DSC

No estudo de compatibilidade (Tabela 6, Figura 25) percebe-se que todos os excipientes provocaram uma variação na temperatura inicial de fusão da EPI (T_{onsetF}). Para as MF de EPI:lactose e EPI:HPMC esta alteração foi mais expressiva, nas quais foram apresentados valores de T_{onsetF} antecipados em 19,82 , 7,25 e 37,38°C respectivamente. Segundo Stulzer e colaboradores (2008), esta antecipação indica que, na presença destes excipientes, os cristais de EPI tornam-se mais susceptíveis à degradação, pois uma quantidade inferior de energia é requerida para desfazer a rede cristalina. Por outro lado, este fenômeno também pode refletir no incremento da solubilidade aquosa da substância, sedo assim um benefício para a EPI, já que a mesma se apresenta insolúvel em água, segundo Guimarães (2013).

Figura 25 – Curvas DSC da EPI e suas misturas físicas, sob razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.



Fonte: produção própria.

Tabela 6 – Valores extraídos das curvas DSC para a EPI e suas misturas físicas.

Amostra	T_{onsetF} (°C)	ΔT_{onsetF} (°C)	ΔE (J.g⁻¹)
EPI pura	221,66	-	-152,44
EPI:amido	221,19	-0,47	-74,46
EPI:lactose	201,84	-19,82	-90,58
EPI:PVP K-30	-	-	-
EPI:celulose microcristalina	220,70	0,96	-75,95
EPI:HPMC	214,15	-7,25	-60,01

Legenda: TonsetF (temperatura inicial de fusão); ΔTonsetF (variação da temperatura inicial de fusão); ΔE (variação de energia); O sinal (-) é utilizado para sinalizar uma antecipação da temperatura, em relação a EPI, enquanto o sinal positivo significa um retardo. Fonte: produção própria.

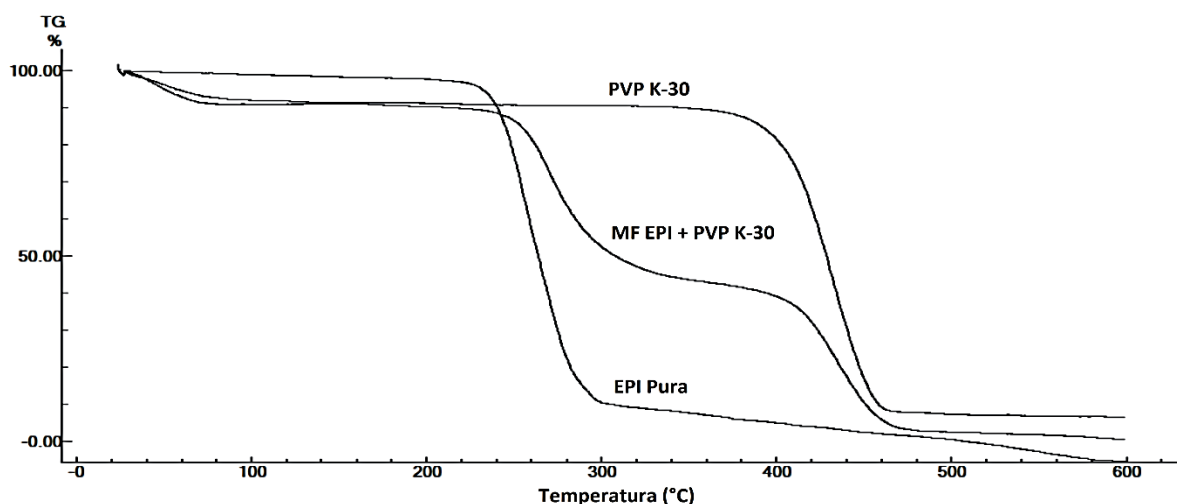
A curva DSC típica da lactose apresenta seu primeiro evento como um pico endotérmico em 140,02°C, que se refere à perda de água de cristalização, tornando-se α-lactose anidra. Em seguida visualiza-se um evento exotérmico, característico da recristalização de α-lactose em β-lactose (208,12°C), com posterior degradação em 198,65°C (LAVOR et al., 2013). Entretanto, na curva DSC da MF EPI:lactose percebe-se que a antecipação do evento de fusão da EPI, com consequente degradação, se sobrepôs ao segundo pico de fusão da lactose (β-lactose), assim como descreve Rolim e colaboradores (2012) em seu estudo de compatibilidade com o citrato de dietilcarbamazina.

Para a MF EPI:PVP K-30, o ponto de fusão da EPI desapareceu (Figura 25). Este fenômeno é um indicativo de interação entre os dois compostos frente ao aquecimento, observado também em diversas outras situações na literatura (SALVIO NETO et al., 2009; TIȚA et al., 2010; TIȚA et al., 2011; COSTA et al., 2013; MELO et al., 2014). Estes estudos evidenciaram que esta interação não representa necessariamente uma incompatibilidade, mas demonstra a miscibilidade entre os dois componentes quando o PVP K-30 é fundido, repercutindo assim em ausência ou redução da intensidade do pico de fusão na curva DSC.

5.2.1.2. TG

Diante dos resultados apresentados pelas curvas DSC, foi avaliado o comportamento da curva TG e DTG das MF propensas à interação. Para a MF EPI:PVP-K30 (Tabela 7, Figura 26), percebe-se que houve retardo da temperatura inicial de degradação do protótipo em 9,76°C. Neste caso, a estabilidade térmica da EPI foi prolongada, uma vez que a mistura física necessita de temperaturas mais altas para iniciar o processo de degradação. Este fenômeno de proteção da substância ativa é alcançado quando ocorre sua incorporação na malha polimérica do excipiente (SOVIZI et al., 2010; VIEIRA et al., 2013; COSTA et al., 2013; MELO et al., 2014).

Figura 26 – Curvas TG da EPI, PVP K-30 e sua mistura física, sob razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹



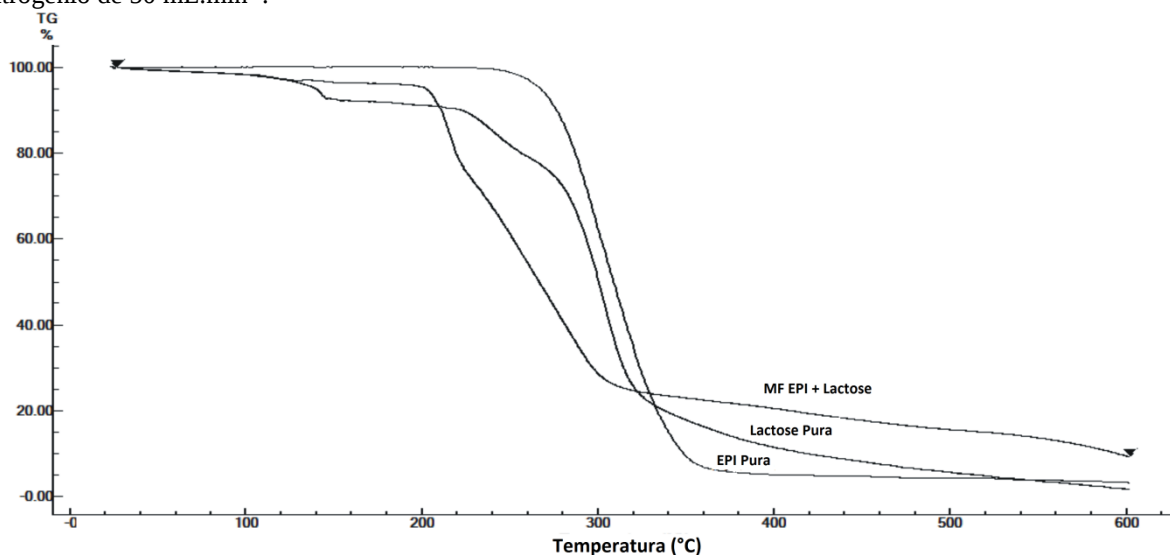
Fonte: produção própria.

Tabela 7 - Valores extraídos das curvas TG para a EPI e as misturas físicas.

Amostras	T _{onsetD} (°C)	ΔT _{onsetD} (°C)
EPI pura	224.98	-
EPI: lactose	198,04	-26,94
EPI:PVP K-30	234.74	+9.76

Legenda: TonsetD (Temperatura inicial de degradação); ΔTonsetD (Variação da temperatura inicial de degradação). O sinal (-) é utilizado para sinalizar uma antecipação da temperatura, em relação a EPI, enquanto o sinal positivo significa um retardo. Fonte: produção própria.

Por outro lado, a curva TG da mistura física EPI:lactose (Figura 27), evidencia antecipação da T_{onsetD} da EPI em 26,94 °C, o que incentiva a hipótese do estabelecimento de interação prejudicial à estabilidade da EPI (MELO et al., 2014).

Figura 27 – Curvas TG da EPI, lactose e sua mistura física, sob razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.

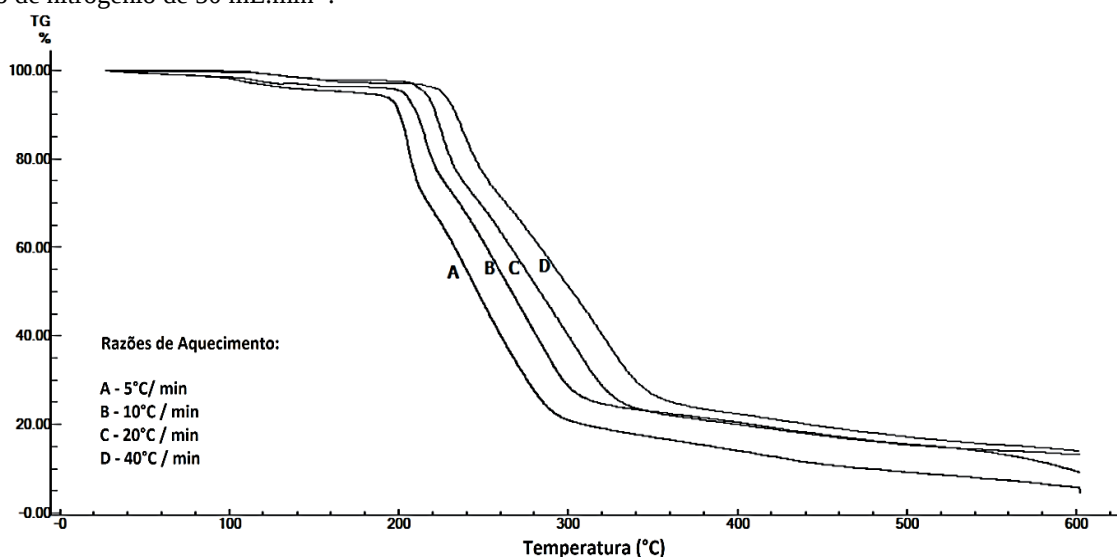
Fonte: produção própria.

5.2.2. Análises complementares

5.2.2.1 Cinética de degradação térmica da Mistura Física EPI: lactose (1:1)

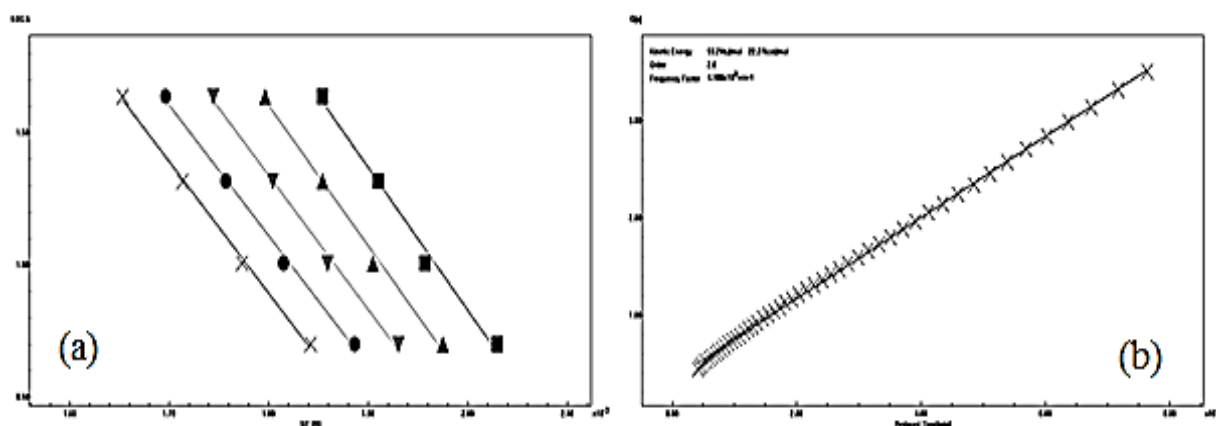
Devido ao sinal de interação evidenciado na curva TG, foram realizadas análises complementares e desta forma, obteve-se a cinética de degradação térmica não isotérmica da mistura física entre EPI e lactose nas mesmas razões de aquecimento a que foi submetida à EPI isolada. As curvas TG obtidas para a MF (Figura 29) também proporcionaram uma boa correlação para plotagem do gráfico $\log A \times 1.K^{-1}$ (Figura 30a, Tabela 8), a partir do modelo proposto por Ozawa (1965). Assim, também foi possível a obtenção do gráfico $G(x) \times$ tempo reduzido (min) (Figura 31b). Conforme demonstram os resultados, a mistura física EPI:lactose apresenta uma cinética de decomposição de 2ª ordem, onde a velocidade da reação é determinada pelas concentrações de duas espécies de reagentes (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Figura 29 - Curvas TG da mistura física EPI: lactose nas diferentes razões de aquecimentos (5; 10; 20 e 40° C), sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.



Fonte: produção própria.

Figura 30 - a) Gráfico log A vs. K^{-1} ; b) Gráfico da função $G(x)$ vs. Inverso da temperatura de EPI



Fonte: produção própria.

Tabela 8 - Linearidade das diferentes ordens de reação da cinética de degradação da mistura física EPI:lactose.

Ordem da reação		Parâmetros					r^2
0	G(x)	0,38	0,47	0,57	0,65	0,71	0,9515
	TR	0,73	1,34	2,35	3,86	5,15	
1 ^a	G(x)	0,46	0,63	0,85	1,07	1,23	0,9783
	TR	0,73	1,34	2,35	3,86	5,15	
2 ^a	G(x)	0,61	0,91	1,33	1,91	2,43	0,9989
	TR	0,73	1,34	2,35	3,86	5,15	

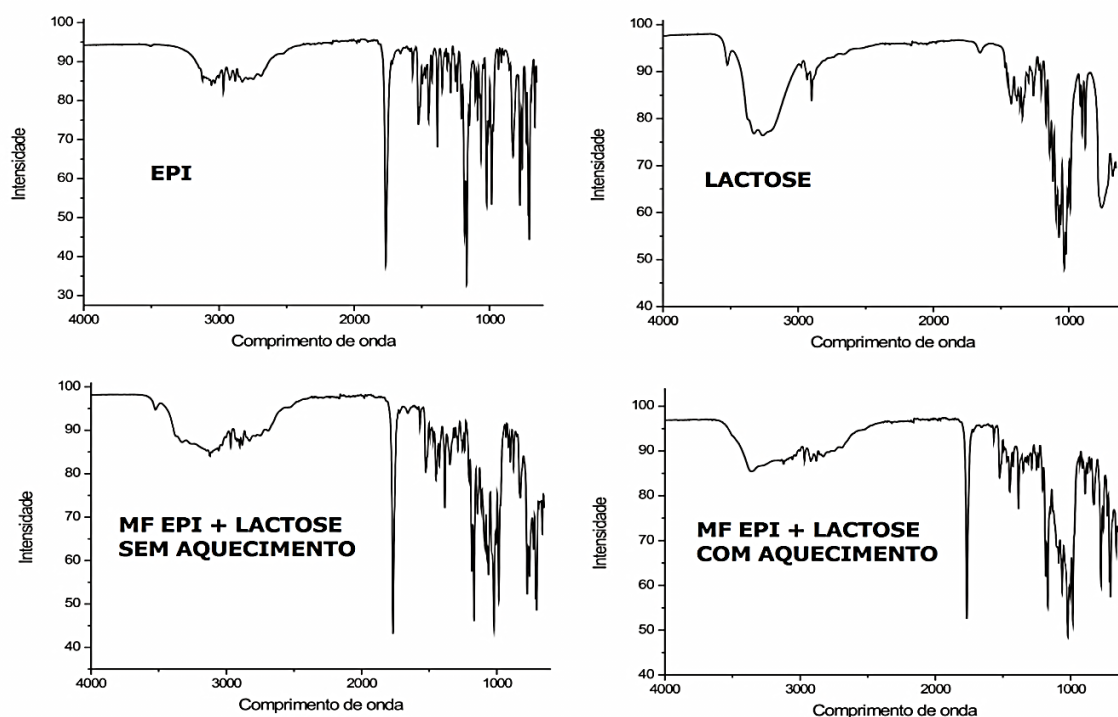
Fonte: produção própria.

Ao inverso do que foi especulado através da interpretação das curvas DSC e TG, nota-se que a análise da cinética de degradação da MF EPI:lactose não comprovou esta incompatibilidade, uma vez que houve um incremento na energia de ativação do sistema ($E_a = 93,21 \text{ kJ.mol}^{-1}$) e no fator frequência ($4,18 \times 10^8 \text{ min}^{-1}$).

5.2.2.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho e Difração de Raio-X.

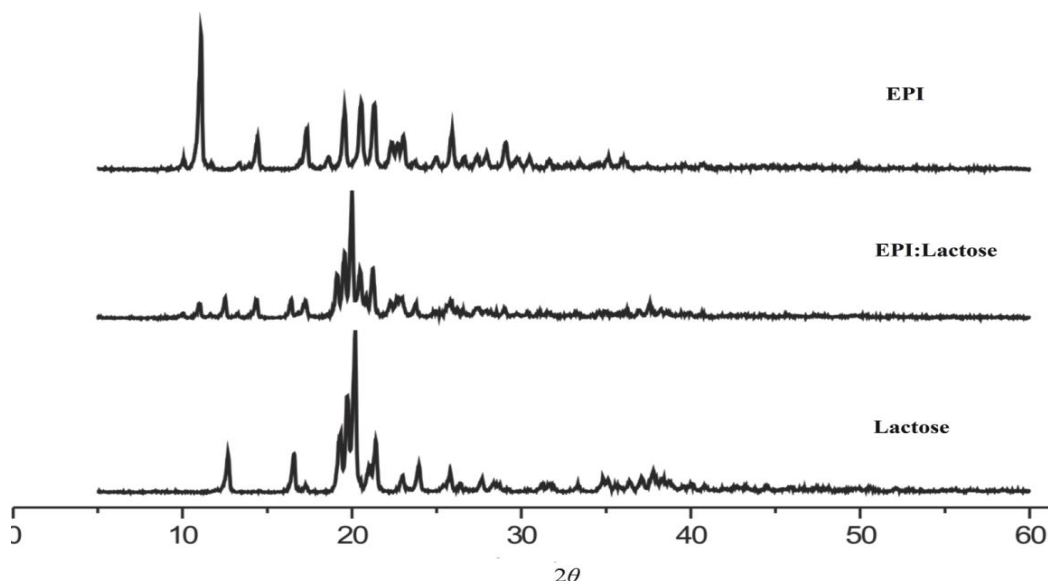
As análises complementares de infravermelho e DRX também não demonstraram alterações que justificassem incompatibilidade (Figura 31 e 32), já que na primeira nota-se que as bandas referentes ao protótipo e excipiente mantiveram-se preservadas, mesmo após aquecidas até 150°C. Já no difratograma de raios-X, percebe-se uma variação discreta quando na mistura física, porém ainda insuficiente para concluir incompatibilidade. Assim, o somatório de resultados colabora com a interpretação de que EPI e lactose são compatíveis.

Figura 31– Espectros de infravermelho da EPI, lactose e sua mistura física antes e após aquecimento até 150°C.



Fonte: produção própria.

Figura 32 – Difratomogramas da EPI, lactose e mistura física



Fonte: produção própria.

5.3 PARTE 3 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO A BASE DE EPIISOPILOTURINA

5.3.1 Obtenção de complexos de inclusão por liofilização

Existem vários métodos para a preparação de complexos de inclusão, por exemplo a liofilização, co-precipitação, atomização, *spray-drying* e fluidização supercrítica. Dentre estes, o método por liofilização consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução através de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de CIs com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Geralmente são obtidos pós secos, amorfos e com elevado grau de interação fármaco:CD (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; CAO et al., 2005; VENTURA et al., 2005; RODRIGUEZ-PEREZ et al., 2006; PIRES, 2011). Estudos descritos na literatura já relatam os melhores resultados pelo método de liofilização, frente a outras técnicas já utilizadas. Como é possível verificar nas análises realizadas Rama e colaboradores (2006) e Soares Sobrinho (2011).

Em relação aos aspectos macroscópicos, para os três casos de complexos obtidos, foi visualizado a formação de um pó branco entrelaçado, com aspecto semelhante à de um algodão (Figura 33), onde, após a maceração, passaram a apresentar características particulares de acordo com a CD utilizada.

Figura 33 - Complexo EPI: β CD, exemplificando o aspecto da amostra antes da retirada do liofilizador.



Fonte: produção própria.

O complexo EPI: β CD (Figura 34) apresentou-se visualmente como um pó fino, branco, mais denso que os demais, além da aparente facilidade para formar “grânulos” e bastante higroscópico, características semelhantes àquelas apresentadas pelo pó de EPI puro.

Figura 34 - Aspecto macroscópico do complexo EPI: β CD (a) em comparação com a imagem da EPI pura (b), evidenciando a semelhança entre as duas amostras.



Fonte: produção própria.

Os CI EPI: SB β CD (figura 35a) e CI EPI: HP β CD (figura 35b) também se apresentam como pós finos e brancos, entretanto é possível observar a formação de cristais translúcidos para o CI EPI: SB β CD (aspecto semelhante aos cristais de sacarose).

Figura 35 - Aspecto macroscópico dos complexos EPI: SB β CD (a) e EPI: HP β CD (b).



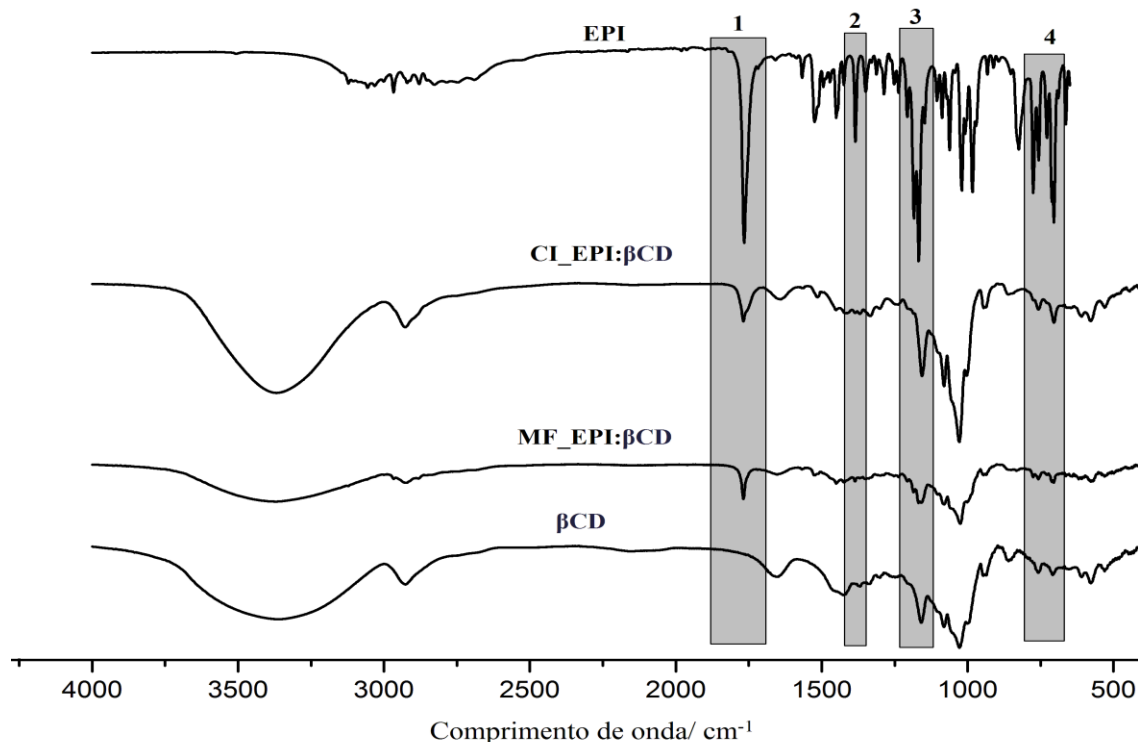
Fonte: produção própria.

5.3.2 Caracterização físico-química dos complexos de inclusão obtidos

5.3.2.1. Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho

A Figura 36 foi dividida em quatro regiões, que correspondem aos picos mais intensos da EPI. Nesta é possível verificar as possíveis interações entre as amostras contendo β CD. Nas regiões 1, 3 e 4 é possível visualizar a presença dos picos característicos da EPI nas amostras da MF e do CI, sem apresentar deslocamento significativo. Já na região 2, houve o total desaparecimento do pico relacionado ao grupamento álcool secundário ligado à molécula orgânica, em 1385 cm^{-1} . Provavelmente, este grupamento químico é o que melhor representa a interação entre EPI e β CD. Além disso, é possível perceber o desaparecimento de picos menores presentes no espectro da EPI, que podem contribuir para esta interação entre o protótipo e a CD (FREITAS et al., 2012).

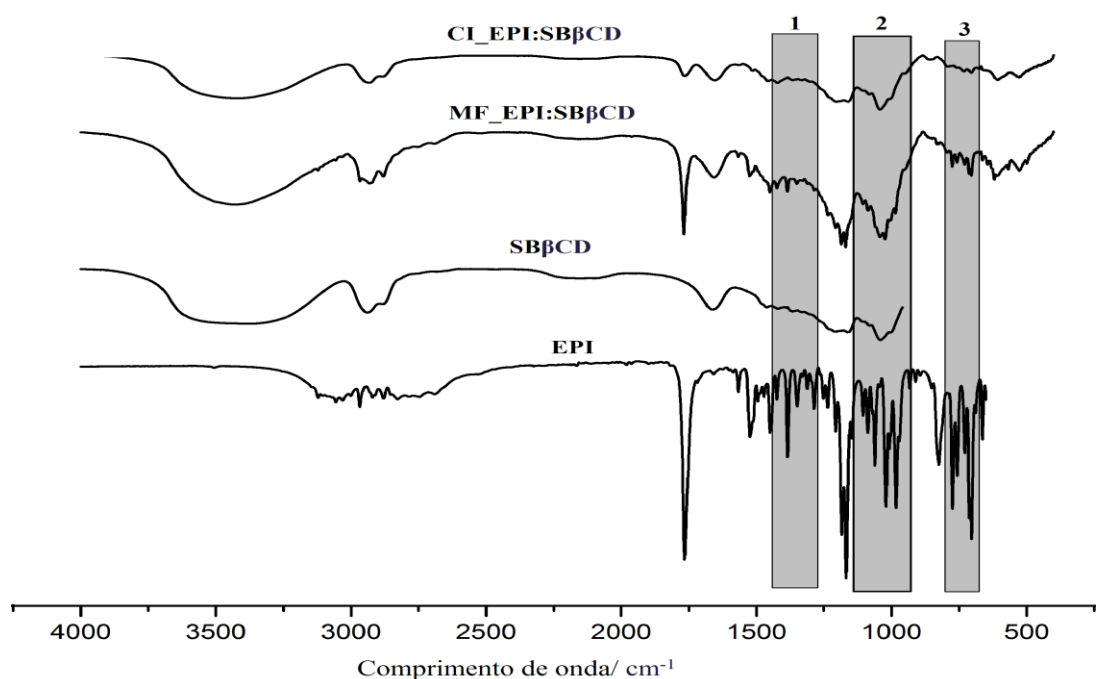
Figura 36 - Espectro de infra-vermelho das amostras de CI EPI: β CD e MF EPI: β CD, sendo comparadas com as amostras de EPI e β CD isoladas.



Fonte: produção própria.

Para o CI EPI:SB β CD, visualiza-se na figura 37 o desaparecimento de picos característicos nas regiões 1 e 3, sendo o primeiro o mesmo visualizado para o CI EPI: β CD. Além deste, a ausência do pico em 771 cm^{-1} , referente à ligação C-H fora de fase do benzeno, evidenciam as principais regiões possíveis de interação entre o protótipo e a SB β CD. A significativa ausência de picos relativos ao protótipo traz um forte indício de interação entre esses componentes.

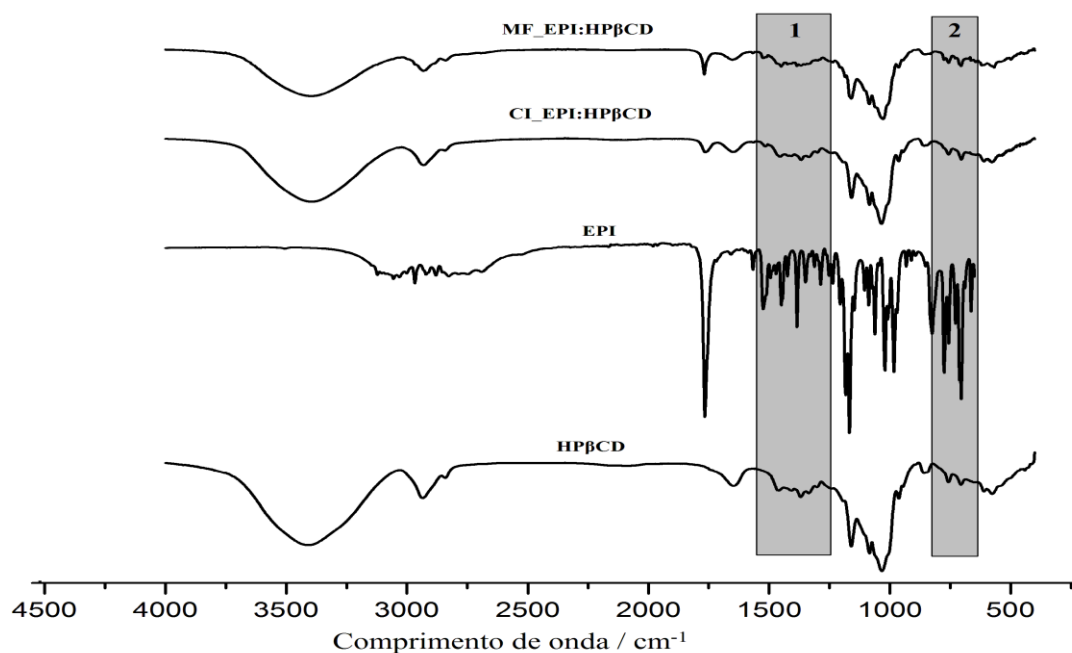
Figura 37 - Espectro de infra-vermelho das amostras de CI EPI:SB β CD e MF EPI:SB β CD, sendo comparadas com as amostras de EPI e SB β CD isoladas.



Fonte: produção própria.

No caso da HP β CD, visualmente a MF e o CI mostraram entre si perfis bastante semelhantes, onde também se verifica a ausência dos principais picos da EPI (figura 38). Na região 1, evidencia-se o desaparecimento do pico em 1385 cm^{-1} , grupamento este igualmente não visualizado em nenhum dos três tipos de CD, sendo este resultado de fundamental importância por oferecer um indício de potencial interação entre o protótipo e CDs avaliadas. Na região 2, tem-se a presença de picos com menor intensidade, porém não se pode afirmar que estes se referem a EPI ou a HP β CD isolados, ou mesmo a junção dos dois.

Figura 38 - Espectro de infra-vermelho das amostras de CI EPI:HP β CD e MF EPI:HP β CD, sendo comparadas com as amostras de EPI e β CD isoladas.

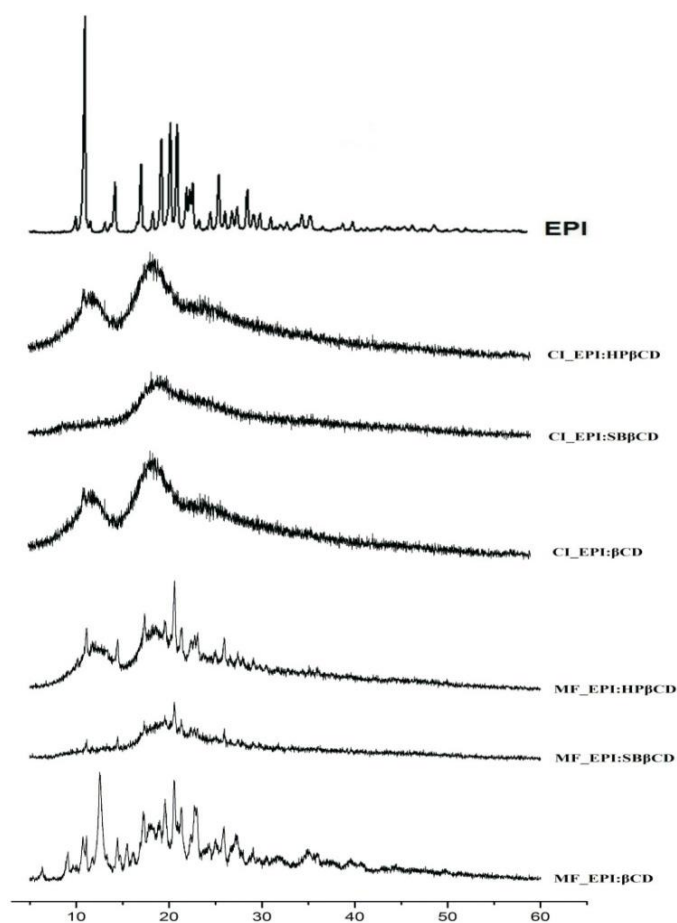


Fonte: produção própria.

5.3.2.2. DRX

De acordo com os difratogramas obtidos (Figura 39), é possível perceber o comportamento cristalino nas MFs EPI:HP β CD e EPI: β CD, justificado pela presença de picos bem definidos. Para a MF EPI:SB β CD os picos estão menos intensos devido a uma redução no tamanho das partículas durante a preparação da MF, porém ainda é possível a sua visualização e conclusão do seu caráter cristalino.

Figura 39 - Difratomogramas da EPI, complexos de inclusão e misturas físicas.



Fonte: produção própria

Já em todos os CIs é possível perceber a completa amorfização do material, caracterizada pela ausência dos picos característicos do protótipo. Esta falta de cristalinidade fornece evidências da formação de complexos de inclusão (WILLIAMS, MAHAGUNA, SRIWONGJANYA, 1998), pois uma vez que a molécula de EPI está inserida na cavidade da CD, este se encontra impossibilitada de interagir com outras moléculas de EPI para formação de sua estrutura cristalina. Desta forma, o produto final apresenta-se completamente amorfo, perfil este característico das CDs.

5.3.2.3 Compatibilidade Protótipo-CD para obtenção de complexos de inclusão

5.3.2.3.1 DSC

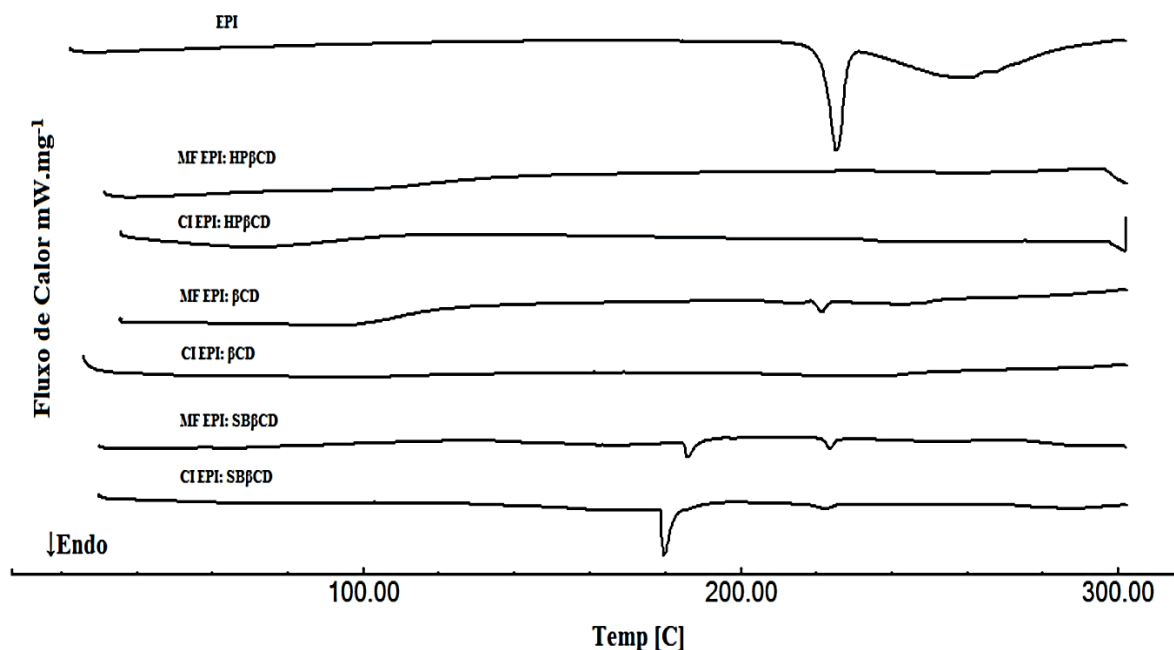
Em estudos realizados por Melo e colaboradores (2014), foi realizada a caracterização térmica da EPI. Neste foi determinada a faixa de fusão do protótipo (221,72 a 228,24°C), sendo esta informação fundamental na análise dos resultados.

As informações obtidas nas curvas DSC são de grande importância para evidenciar a complexação de moléculas do protótipo na cavidade hidrofílica das CDs, utilizando como principais parâmetros a mudança da temperatura ou o desaparecimento do evento endotérmico, relacionado a fusão ou sublimação, da molécula pura quando na forma de complexos (TROTTA, ZANETTI, CAMINO 2000; Al-RAWASHDEH; AL-SADEH; AL-BITAR, 2013).

A MF EPI:βCD apresenta dois eventos endotérmicos: o primeiro, com temperatura inicial de 94,34°C, característico do processo de desidratação da βCD (Al-RAWASHDEH; AL-SADEH; AL-BITAR, 2013) e na temperatura de 219°C visualiza-se o segundo pico bem definido, referente ao processo de fusão do protótipo, evidenciando uma antecipação da temperatura inicial de fusão da EPI de 2,09°C (Figura 40, tabela 9). Já no CI EPI: βCD (Figura 40, tabela 9) houve o desaparecimento do primeiro evento endotérmico, presente na MF, e a redução significativa da intensidade do segundo pico, sugerindo um grau de complexação entre a EPI e a βCD, devendo ser confirmada após a realização de técnicas complementares (FREITAS et al., 2012).

Em relação a MF EPI:HPβCD (Figura 40, tabela 9) percebe-se um pico endotérmico largo em torno de 72°C, também referente a desidratação da CD (LIU et al., 2014), porém com menor intensidade para o CI correspondente. Para os dois casos não foi possível visualizar a presença do pico referente a fusão do protótipo, sendo este total desaparecimento um forte indicativo de interação entre a EPI e a HPβCD, podendo sugerir também a sua complexação (LIU et al., 2014; CHADHA et al., 2011; FREITAS et al., 2012).

Figura 40 - Curvas DSC da EPI e das MFs e CIs obtidos, sob razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$.



Fonte: produção própria

Tabela 9 - Valores extraídos das curvas DSC para a EPI, CI e suas misturas físicas.

Amostra	$T_{\text{onsetF}} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_{\text{onsetF}} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta E (\text{J}.\text{g}^{-1})$
EPI pura	221,66	-	-152,44
CI EPI+ SB β	178,10	-43,56	-23,61
MF EPI+ SB β	184,28	-37,38	-8,93
CI EPI+ β CD	214,18	-7,49	-3,12
MF EPI+ β CD	219,57	-2,09	-13,69
CI EPI+ HP β CD	---	----	----
MF EPI+ HP β CD	---	----	----

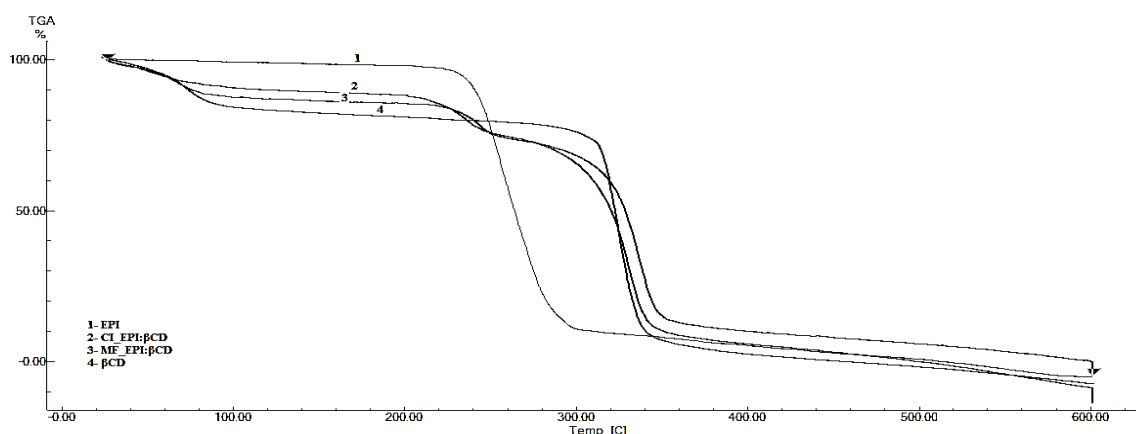
Legenda: TonsetF (temperatura inicial de fusão); ΔT_{onsetF} (variação da temperatura inicial de fusão); ΔE (variação de energia); O sinal (-) é utilizado para sinalizar uma antecipação da temperatura, em relação a EPI, enquanto o sinal positivo significa um retardo. Fonte: produção própria

Em relação à MF EPI:SB β CD, o CI mostrou um comportamento diferente dos demais (Figura 40). Em sua curva DSC foi evidenciado dois picos endotérmicos bem definidos. O primeiro evento é referente à fusão do prototipo, que aparece antecipado em 43,56°C, Tabela 9. O segundo pico está relacionado ao evento de fusão da CD, como já relatado na literatura (FRANZINI 2011). Desta forma, para melhor entender este comportamento e se o mesmo pode ser considerado como um indicativo de interação, técnicas adicionais são requeridas para esta avaliação.

5.3.2.3.2 TG

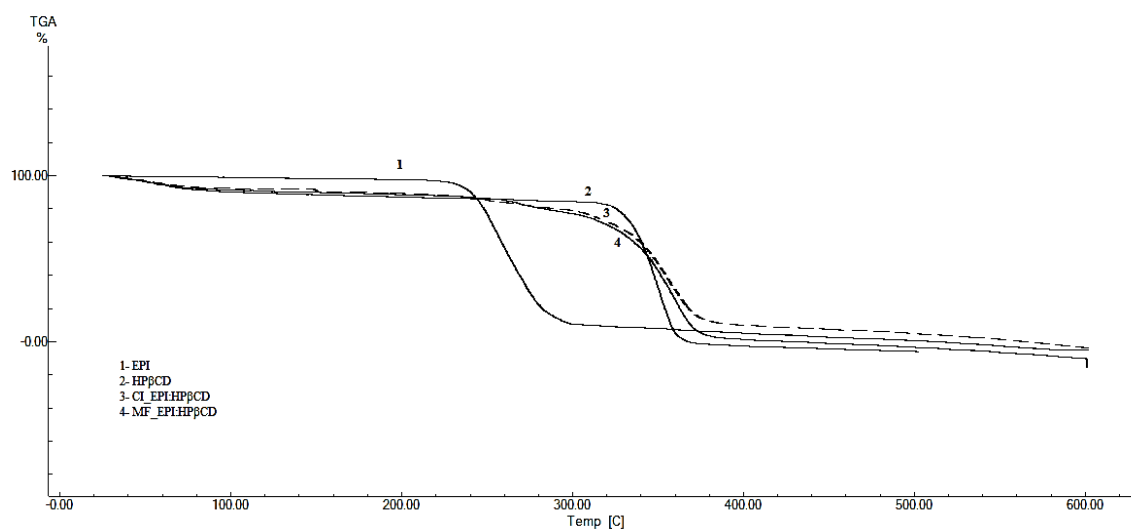
As curvas TG/DTG dos CIs EPI: β CD (Figura 41), EPI:HP β CD (Figura 42) e EPI:SB β CD (Figura 43), demonstraram retardos significativos na temperatura inicial de degradação da EPI isolada (Tabela 10). Este fenômeno é amplamente relatado na literatura (Del VALLE 2004; CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; GARCIA-FERNANDEZ et al., 2013; XU et al., 2014), visto que as ciclodextrinas tem a capacidade de proteger substâncias associadas da ação do calor. Assim, pode-se afirmar que esta é uma característica benéfica, pois permite que o protótipo suporte temperaturas mais elevadas sem sofrer o processo de degradação, aumentando assim sua estabilidade térmica.

Figura 41 - Curvas TG da EPI, β CD, CI e MF EPI: β CD, em razão de aquecimento de 10°C, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.



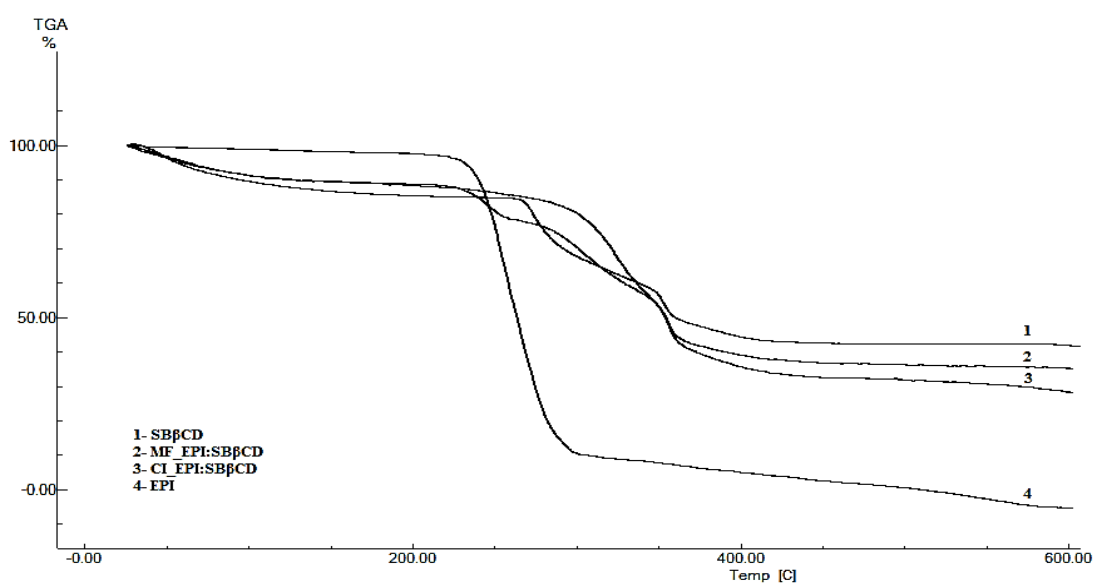
Fonte: produção própria

Figura 42 - Curvas TG da EPI, HP β CD, CI e MF EPI:HP β CD, em razão de aquecimento de 10°C, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.



Fonte: produção própria

Figura 43 - Curvas TG da EPI, CI e MF EPI:SB β CD, em razão de aquecimento de 10°C, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.



Fonte: produção própria

Tabela 10 - Valores extraídos das curvas DSC para a EPI, CI e suas misturas físicas.

Amostras	T _{onsetD} (°C)	ΔT _{onsetD} (°C)
EPI pura	224,98	-
CI_EPI:SBβCD	342,80	+117,82
MF_EPI:SBβCD	345,23	+120,25
CI_EPI:βCD	297,40	+72,42
MF_EPI:βCD	311,40	+86,42
CI_EPI:HPβCD	315,10	+90,12
MF_EPI:HPβCD	315,10	+90,12

Legenda: TonsetD (Temperatura inicial de degradação); ΔTonsetD (Variação da temperatura inicial de degradação). O sinal (-) é utilizado para sinalizar uma antecipação da temperatura, em relação a EPI, enquanto o sinal positivo significa um retardo. Fonte: produção própria

Correlacionando os resultados obtidos a partir das curvas DSC, TG e DTG, pode-se inferir que não há indícios de incompatibilidade da EPI frente os três tipos de CDs testadas. Assim, os eventos indicativos de interação entre os componentes parecem estar mais relacionados à complexação do protótipo na cavidade das CDs. Para uma melhor análise, se faz necessária a investigação com outras técnicas.

Confrontando os dados obtidos para estes CIs, na análise térmica ainda foi possível visualizar picos de fusão do fármaco, indicando a presença do protótipo ainda em seu estado cristalino (CI EPI: SBβCD). Enquanto pela técnica de DR-X, este apresenta um comportamento completamente amorfo, podendo este facto ser atribuído à diferença de sensibilidade entre as técnicas em questão (MEDEIROS, 2013). Sabe-se que a estrutura dos complexos no estado sólido não é idêntica àquela dos complexos em solução. Em solução, a molécula “hóspede” está localizada dentro da cavidade da CD e todo complexo é rodeado por múltipla camada de hidratação. No estado cristalino, as moléculas “hóspedes” estão localizadas não somente no interior da cavidade da CD, mas também entre seus anéis, na forma de anéis inclusos entrelaçados (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999).

No estado sólido, há disponibilidade de moléculas de EPI na parte externa à CD, que devido a maior sensibilidade observada pelo DSC (MEDEIROS, 2013), estas podem ser suficiente detectadas, repercutindo na presença de picos de fusão do protótipo nos termogramas obtidos. Esta constatação não compromete os resultados satisfatórios a respeito da formação de CI.

5.3.2.3 Avaliação do perfil de dissolução da epiisopiloturina versus complexos de inclusão

A complexação com CDs têm desempenhado um papel muito importante na formulação de drogas fracamente solúveis em água. Visto que a solubilidade constitui um requisito prévio à absorção e obtenção de resposta clínica para a maioria dos medicamentos administrados por via oral. Os efeitos observados a partir da formação de CIs sobre as propriedades de dissolução de um fármaco podem ser atribuídos a fatores como mudança no seu estado cristalino e aumento da sua molhabilidade, refletindo diretamente na sua solubilidade aparente (SPRICIGO et al., 2008). Estes fatores reforçam a importância e a necessidade da realização dos estudos de dissolução, para então, ser possível melhor avaliar a eficácia da complexação.

Visando a obtenção de uma forma farmacêutica de liberação imediata, os estudos de dissolução podem ser classificados em três categorias, que permitem avaliar e comparar a eficiência de dissolução de um determinado produto, sendo elas: 1) ensaio de um único ponto; 2) ensaio de dois pontos; 3) perfis de dissolução. Neste último se avalia a porcentagem dissolvida da molécula em diferentes tempos de amostragem, o que permite uma análise mais detalhada e conclusiva (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

A eficiência de dissolução (ED%) sugerida inicialmente por Khan e Rhodes (1975) pode ser definida como a área sob a curva de dissolução (AUC) em um determinado intervalo de tempo, permitindo a comparação mais fidedigna entre dois produtos. Além disso, este parâmetro está relacionado com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (SKOUG et al., 1997; OFOEFULE et al., 2001).

Com base nas informações obtidas através da determinação do pKa do protótipo, percebe-se que, apesar de completamente dissociada em pH 1,2, a EPI está na sua forma ionizada no ambiente estomacal, sendo este um empecilho para sua absorção nesta região. Assim, é fatalmente esperado que a EPI seja absorvida na região do duodeno-intestino. Uma vez que o prototipo se encontra em seu maior percentual não ionizado no pH 6,8, esta condição foi escolhida para avaliar os benefícios oferecidos pela complexação com as CD, além de demonstrar ser um meio mais discriminativo que o pH ácido.

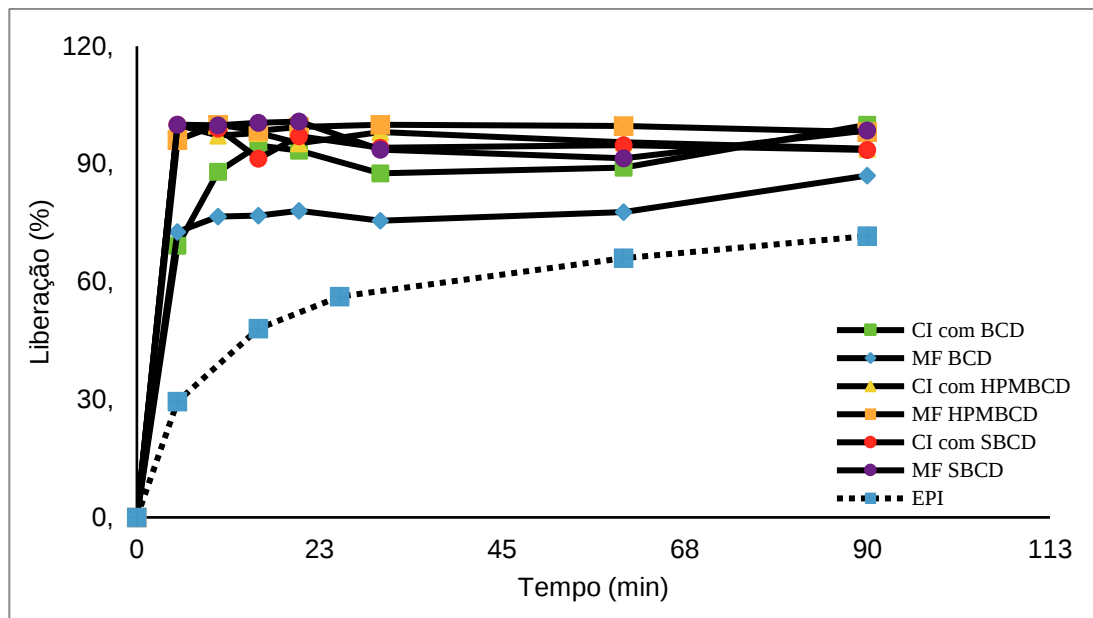
Os perfis de dissolução, neste estudo, foram obtidos através de coletas seriadas nos intervalos de tempo pré-definidos, de acordo com a tabela 11 e figura 44, e a partir destes, foi possível estabelecer a eficiência de dissolução (ED%) de cada amostra analisada.

Tabela 11- valores obtidos a partir da dissolução das amostras analisadas, em pH 6,8. Eficiência de dissolução de EPI dissolvido, nos tempos 0; 5; 15 ; 30 ; 60 e 90 min. Representadas em valores percentuais.

Tempo (min)	EPI	MF EPI:βCD	CI EPI:βCD	MF EPI:HPβCD	CI EPI:HPβCD	MF EPI:SBβCD	CI EPI:SBβCD
0	0	0	0	0	0	0	0
5	29,5	72,7 ± 4,40	69,2 ± 7,44	96,1 ± 2,84	99,99 ± 3,75	99,99 ± 3,46	99,99 ± 5,95
15	48,1	76,88 ± 1,34	94,72 ± 4,03	98,46 ± 0,45	97,92 ± 3,03	100,47 ± 7,45	91,38 ± 1,42
30	56,21	75,58 ± 2,21	87,64 ± 4,5	99,99 ± 2,94	98,17 ± 2,57	93,69 ± 7,01	94,11 ± 13,47
60	66	77,72 ± 1,34	89,13 ± 5,66	99,67 ± 2,98	95,53 ± 3,14	91,45 ± 11,06	94,8 ± 9,80
90	71,64	87,05 ± 1,11	99,99 ± 6,83	98,14 ± 4,06	93,87 ± 3,79	98,53 ± 2,04	93,56 ± 9,08

Fonte: produção própria.

Figura 44 – Perfil de dissolução de todas as amostras analisadas.



Fonte: produção própria

Quando comparados com o protótipo puro, todas as amostras analisadas (CIs e MFs) apresentaram uma melhora no perfil de dissolução. Entre os CIs o resultado mais satisfatório foi o obtido com a β CD, apresentando um notável incremento no perfil de dissolução da EPI, sendo este superior ao visualizado para a sua MF. A área sob a curva, tabela 12, permite inferir que a complexação com a β CD aumentou em 1,8 vezes a dissolução do fármaco ($AUC = 473,13$). Além disso, o produto obtido foi capaz de conferir a EPI uma liberação imediata, visto que em 15 min foi possível atingir 94,7% de protótipo em solução.

Tabela 12 - Valores de *AUC* obtidos para os CIs e MFs

Eficácia de Dissolução (<i>AUC</i>)		
	CI	MF
EPI: βCD	859,1	845,13
EPI: HPβCD	810,279	960,99
EPI: SBβCD	685,9	753,95

Fonte: Autor próprio

Já os CIs EPI:HP β CD e EPI:SB β CD demonstraram um comportamento bastante semelhante (tabela 11; figura 44). Ambos foram capazes de dissolver 99,99 % da EPI já nos primeiros 5 minutos de análise. Adicionalmente, através da área sobre a curva, percebe-se que suas respectivas MFs também apresentaram um eficiente incremento do perfil de dissolução do protótipo, sendo superior aos CIs, tabela 12.

Este fato está associado às propriedades surfactantes das CDs, que reduzem a tensão interfacial entre o protótipo e o meio de dissolução, causando um significativo aumento na sua taxa de dissolução (RAMA et al., 2006; FREITAS et al., 2012; MURA et al., 2014). Além de poder estar relacionada ao tratamento mecânico, responsável por aumentar a superfície de contato entre o fármaco e o carreador, devido à diminuição no tamanho das partículas da EPI, quando submetidas ao processo de obtenção das MF, por meio da masceração dos seus constituintes (FRANZINI, 2011).

Diversos estudos que também abordam os benefícios atribuídos à presença da CD. Nestes, a maior molhabilidade atribuída a estas moléculas já foi suficiente para proporcionar uma boa dissolução de fármacos em diferentes meios estudados. Allem e colaboradores (2008) analisam complexos formados pela β CD e HP β CD, sendo observado em seus resultados a semelhança entre os perfis de dissolução obtidos para os CI e MFs.

Desta forma, com base nos resultados obtidos é possível inferir que o método de complexação por liofilização se mostrou eficiente, conferindo a EPI uma rápida dissolução, fator este de fundamental importância por se tratar de uma promissora molécula que se apresenta insolúvel em meio aquoso. Adicionalmente a presença da CD foi capaz de melhorar a dissolução da EPI, independente do processo utilizado.

Conclusão

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

6 CONCLUSÃO

PARTE 1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROTÓTIPO EPIISOPILOTURINA

- ✓ A identidade química da epiisopiloturina foi confirmada através da técnica de espectrometria na região do infra-vermelho, com base em estudos anteriores realizados por Vêras e colaboradores (2013);
- ✓ A caracterização da EPI por DRX e pela MEV confirmam o comportamento cristalino da amostra.
- ✓ A partir da análise térmica foi possível evidenciar os eventos de fusão e degradação, onde estes dados serviram de suporte para atender os objetivos posteriores deste trabalho;
- ✓ A obtenção da cinética de degradação térmica não-isotérmica revelou uma reação de ordem 1, com energia de ativação de 88,95 kJ.mol⁻¹.
- ✓ O pKa da EPI encontrado foi de 7,29, demonstrando que a molécula se encontra em sua maior parte ionizada durante toda a extensão do trato gastrointestinal.
- ✓ De acordo com as modificações realizadas, a partir do método de partida (Avancini et al., 2003) foi possível se obter um método de quantificação dentro dos objetivos pretendidos neste tópico (área de pico e Tempo de retenção).
- ✓ A determinação do perfil de dissolução da EPI evidenciou que a mesma apresenta uma rápida dissolução em meio ácido (apresentou 97,34% de dissolução em 15 minutos) enquanto que em meio básico foi visualizado apenas 48,1% em meio pH 6,8 (15 minutos).

PARTE 2 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FRENTE A EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

- ✓ Os testes de compatibilidade térmica da EPI frente aos excipientes: Lactose monohidratada; Amido ; Celulose Microcristalina; PVP K-30; β CD; SB β CD e HP β CD, mostraram uma possível interação entre a EPI e a lactose, porém pelo DRX, IV e cinética de degradação

não foi comprovada essa incompatibilidade. Desta forma, conclui-se que a EPI é compatível com todos os excipientes testados.

PARTE 3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO A BASE DE EPIISOPILOTURINA

A complexação da EPI nas CDs testadas pode ser confirmada pelas mesmas técnicas de caracterização a que o protótipo foi submetido, que evidenciam fortes indícios de interações com o protótipo.

A obtenção dos CI incrementou de forma satisfatória o perfil de dissolução da EPI em pH 6,8 (cerca de 1,8x). Apesar de as misturas físicas terem apresentado perfil semelhante, é possível perceber que não houve complexação nestas, sendo questionável a durabilidade deste efeito, devido à estabilidade do sistema.

Perspectivas

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

7 PERSPECTIVAS

- Determinar a Solubilidade da EPI;
- Realizar estudo de estabilidade em condições forçadas do protótipo; com a finalidade de estabelecer a estabilidade da molécula;
- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar a EPI e seus possíveis produtos de degradação, simultaneamente;
- Desenvolver e caracterizar novos CI obtidos por outras técnicas de complexação;

Referências

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P.; EBERLIN, M.N.; ZULLO, M.A.T.; SAWAYA, A.C.H.F. Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 21: 1205–1213, 2007.

ALEEM, O.; KUCHEKAR, B.; PORE, Y.; LATE, S. Effect of β -cyclodextrin and hydroxypropyl β -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 47 , 535–540, 2008.

AL-RAWASHDEH, N.; AL-SADEH, K.S.; AL-BITAR, M.B. Inclusion Complexes of Sunscreen Agents with β -Cyclodextrin: Spectroscopic and Molecular Modeling Studies. **Journal of Spectroscopy.** p. 11. doi.org/10.1155/2013/841409, 2013.

ARAÚJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Pós-graduação Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (USP), 2003.

ARAÚJO, A.A.S.; BEZERRA, M.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determination of the melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. **Brazilian journal of pharmaceutical Science**, v. 46, n. 1, pp. 37-43, 2010.

ASTRAY, G.; GONZALES BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL OTERO, R., IMALGANDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids.** v.23, n.7, pp. 1631–1640, 2009.

ATAS, L. Atenção à pobreza. **Rev Pesq Fapesp** 91. 2003.

AVANCINI, G.. ABREU, I.N.; SALDAÑA, M.D.A.; NOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry.** v63, pp. 171–175, 2003.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

BANETH, G., SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.** v106, pp. 315–24. 2002.

BARNABÉ, E.C. **Extração de pilocarpina e epiisopiloturina de jaborandi utilizando processos envolvendo solventes supercríticos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos). Pós graduação em Engenharia química. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 2a ed., Art Med Ltda: Porto Alegre, 2008.

BERNAL, C.; COUTO, A.B.; BREVIGLIERI, S.T.; CAVALHEIRO, É.T.G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, pp. 849-855, 2002.

BOX, K.; BEVAN, C.; COMER, J.; HILL, A.; ALLEN, R.; REYNOLDS, D. High Throughput Measurement of pKa values in a mixed-buffer linear pH gradient system. **Anal. Chem.** v. 75, n. 4, p. 883-892, 2003.

BOZKIR, A.; DENLI, Z. F.; BASARAN, B. Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the solubility, stability and in-vitro release of ciprofloxacin for ocular drug delivery. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 69(4), 719–724. 2012.

BRITTAİN, H.G. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**, 2 ed, Marcel Dekker, New York,. pp. 448 , 1999.

BRITTAİN, H.G.; BOGDANOWICH, S.J.; BUGAY, D.E.; DEVINCENTIS, J.; LEWEN, G.; NEWMAN, A.W. Physical characterization of pharmaceuticals solids. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 963-973, 1991.

BROWN, M.E. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications.** 2nd ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2001.

BUDAL, R.M. **Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas.** Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Dev Ind Pharm**; v31, n.8. pp. 747-56, 2005.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n.2, pp. 78–99, 2007.

CASTRO, J.F. **A relação entre patentes farmacêuticas, doenças negligenciadas e o programa público brasileiro de produção e distribuição de medicamentos**. Dissertação (Mestrado em Sociologia) Programa de pós-graduação em Sociologia. UNESP/Araraquara, 2012.

CHADHA, R.; ARORA, P.; GUPTA, S.; JAIN, D. S. Complexation of nevirapine with β -cyclodextrins in the presence and absence of Tween 80: Characterization, thermodynamic parameters, and permeability flux. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.105, pp. 1049–1059, 2011.

CHADHA, R., BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82– 97, 2014.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. **AAPS PharmSciTech** , v.6; n. 2, 2005.

CHEN, M.; ZHANG, W.; JIANG, R.; DIAO, G. Development of glucose amperometric biosensor based on a novel attractive enzyme immobilization matrix: Amino derivative of thiocalixarene. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n(2), pp. 177–183, 2011.

CHENG, Y.; HUANG, Y.; ALEXANDER, K.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis study of methyl salicylate. **Thermochimica Acta**, v. 367-68, pp. 23-28, 2001.

CIDES, L.C.S.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal behaviour, compatibility study and decompositions kinetics of Glimepiride under isothermal and nonisothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 84, pp. 441-45, 2006.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasil, 123 - 129, 1984.

COSTA, O.V. **Multiplicidade estrutural no paracetamol no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em gestão, pesquisa e desenvolvimento em tecnologia farmacêutica). Programa de pós-graduação em gestão, pesquisa e desenvolvimento em tecnologia farmacêutica, Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, 2009.

COSTA, R.S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará, 2010.

COSTA, S.P.M.; SILVA, K.E.R.; MEDEIROS, G.C.R.; ROLIM, L.A.; OLIVEIRA, J.F.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; NETO-ROLIM, P.J. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, v. 562, pp. 29– 34, 2013.

CUFFINI, S.L.; ELLENA, J.F.; MASCARENHAS Y.P.; AYALA, A.P.; SIELSER, H.W.; MENDES FILHO, J.; MONTI, G.A.; AIASSA, V.; SPERANDEO, N.R. Physicochemical characterization of deflazacort: Thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, p. 261–269, 2007.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L.Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.1-9, 2007.

DAVIS, M. E., BREWSTER, M. E. Cyclodextrin, based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, pp. 1023–1035, 2004.

DE MELO, N.F.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L. F. Interaction between nitroheterocyclic compounds with β -cyclodextrins: phase solubility and HPLC studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V.47, pp. 865–869, 2008.

Del VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**. v.39 pp. 1033–1046, 2004.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

DEORSOLA, A.C.; MOTHÉ, C.G.; OLIVEIRA, L.G.; DEORSOLA, A.B. Technological monitoring of cyclodextrin e World panorama. **World Patent Information**. pp. 1-9. doi:10.1016/j.wpi.2014.06.004, 2014.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím Nova**. v. 32, pp. 2444-57, 2009.

DRUNKLER, D.A., FETT, R., LUIZ, M.T.B. Polímeros de ciclodextrina: características, formação de complexos de inclusão e aplicações industriais. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 21-32, 1999.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEW, D. Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives, part I. **Pharmaceutical Technology**, v.6, pp. 26-34, 1990.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, V ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2010.

FELIX, F.S.; CIDES, L.C.S.; ANGNES, L.; MATOS, J.R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of Salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v.95, n.3, pp. 181-214, 2009.

FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R.; SILVA, F.C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 623-638, 2009.

FIGUEIRÊDO, E.R.; VIEIRA, J.C.; SOUZA, J.J.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; MILTON, M.; KANASHIRO, M.M.; CORTÊS, F.H. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcaloides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmännii* (A. DC.), Apocynaceae. **Braz. J. Pharmacogn.** v.20, n.5, 2010.

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano. **Química nova interativa**. Acesso em 10/02/2015. Disponível em <<http://qnint.sbg.org.br/qni/visualizarConceito.php?idConceito=14>>

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em farmácia**. 2ª edição. Pharmabooks São Paulo, 2011.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

Food and Drug Administration – FDA; **Guidance for Industry Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms**, 1997.

FRANZINI, M.C. **Complexos de inclusão de anfotericina b com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011.

FREITAS, M.R.; ROLIM, L.A.; SOARES, M.F.R.; ALBUQUERQUE, M.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v.89, pp. 1095–1100, 2012.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 15, n.2, pp. 178-182, 2005.

GARCIA-FERNANDEZ, M. J.; TABARY, N.; MARTEL, B.; CAZAUX, F.; OLIVA, A.; TABOADA, P. Poly-(cyclo)dextrins as ethoxzolamide carriers in ophthalmic solutions and in contact lenses. **Carbohydrate Polymers**, v.98, n.2, pp. 1343–1352, 2013.

GIORGIO, C.D.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. In vitro activity of the β -carboline alkaloids harmine, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**. vol.106, n. 3–4, pp. 67–74, 2004.

GOMES, J.P.M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara – SP, 2008.

GONSALES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; LEITE-FILHO, C.A.; MEDEIROS, F.S. Contextualizando reações ácido-base de acordo com a teoria protônica de brönsted-lowry usando comprimidos de propranolol e nimesulida. **Quim. Nova**, v. 36, n. 8, pp.1236-1241, 2013 .

GONZÁLES, P.; MARÍN, C.; HITOS, A.B.; ROSALES, M.J.; REINA, M.; DÍAZ, J.G. GONZÁLES-COLOMA, A. SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro activity of C₂₀-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, pp. 136–141, 2005.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Tradução de: COSENDEY, C. H. A.; VASCONCELOS, M. M.; VOEUX, P.; SETÚBAL, S. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Rev. Bras. Farm.** V.89, n.3, pp. 220-225, 2008.

GUIMARÃES, M.A.; CAMPELO, Y.D.M.; VERAS, L.M.C.; COLHONE, M.C.; LIMA, D.F.; CIANCAGLINI, P.; Kuckelhaus, S.S.; Lima, F.C.A.; MORAES, J.; LEITE, J.R.S.A. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and In Vitro Schistosomicidal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 13, pp. 1–10, 2013.

HEIJDEN, R.D.; VERPOORTE, R.; HARKES, P.A.A. *Tabernaemontana* spp.: In Vitro Production of Indole and Biogenetically Related Alkaloids. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v.7, pp. 506-523, 1989.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.RH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTEZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis: UFSC, 641-656, 2000.

HICKS, K.B.; HAINES, R.M.; IONG, C. B. S.; SAPERS, G. M.; EL-ATAWY, Y.; IRWIN, P.L.; SEIB, P.A. Inhibition of enzymatic browning in fresh fruit and vegetable juices by soluble and insoluble forms of β -cyclodextrin alone or in combination with phosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, pp. 2591-2594, 1996.

HU, L.; ZHANG, H.; SONG, W.; GU, D.; HU, Q. Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v.90, n.4, pp. 1719–1724, 2012a.

HU, X.; WEI, B.; LI, H.; WU, C.; BAI, Y.; XU, X. Preparation of the β -cyclodextrin-vitamin C (β -CD-Vc) inclusion complex under high hydrostatic pressure (HHP). **Carbohydr Polym.** v.90, n.2, pp. 1193, 2012b.

IBGE, Prod. Extr. veg. e Silvíc., Rio de Janeiro, v. 21, p.1-45, 2006.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. disponível em http://www.cdts.fiocruz.br/inct-idn/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=112&Itemid=61%20, acesso em 02 de janeiro de 2014.

IVANISEVIC, I.; MCCLURG, R.B.; SCHIELDS, P.J. Uses of x-ray powder diffraction in the pharmaceutical industry. In: GAD, S.C. (Ed.) **Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: drug discovery, development, and manufacturing**. John Wiley & Sons, Inc., 2010.

JENKINS, R.; SNYDER, R.L. **Introduction to X-Ray Powder Diffractometry**, Wiley-Interscience, New York, 432 p, 1996.

JOY, D.C. Scanning microscopy for materials characterization. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 2, pp. 465-468, 1997.

JÚLIO, T.A.; ZÂMARA, I.F.; GARCIA, J.S.; TREVISAN, M.G. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC-UV. **J Therm Anal Calorim**, v. 111, pp. 2037-2044, 2013.

KHAN, K.A., RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. **J. Pharm. Pharmacol.** London, v.27, pp. 48- 49, 1975.

KOLLENGODE, A.N.R.; HANNA, M. A Cyclodextrin complexed flavors retention in extruded starches. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 5, p. 1057-1060, 1997.

KOROLKOVAS, A. **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p 207, 1984.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins . **International Journal of Pharmaceutics**. v.53, pp.167- 180, 2013.

LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H.A.; KANIG, J.L **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica** 1. ed. Lisboa: Fundação Galoute Guldenkian,. v. II, pp. 1017, 2001.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

LARSSON, C. E.; LARSSON JR., C. E.; LEITE, C. A. L.; ANDRADE, S. F.; BRITO, A.F., Terapêuticas Tópica e Sistêmica: Pele, Ouvido e Olho. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca. p. 179-186, 2008.

LAU, E. Preformulation studies. In: AHUJA, S.; SEYPINSKI, S.(Eds) **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis**. San Diego: Elsevier. pp. 173-233, 2011.

LAVOR, E. P.; NAVARRO M. V. M.; FREIRE F. D.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; LIMA.; MOURA T. F. A. Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs–excipient compatibility. **J Therm Anal Calorim**. DOI 10.1007/s10973-013-3050-2, 2013.

LAZAROWSKA, A.; JÓZEFOWICZ, M.; HELDT, J.R. Spectroscopic studies of inclusion complexes of methyl-p-dimethylaminobenzoate and its ortho derivative with α - and β -cyclodextrins. **spectrochimica Acta Part A**. v.86, pp.481– 489, 2012.

LEVERRIER, A. BERO, J. FRÉDÉRICH, M. QUETIN- LECLERCQ, J. PALERMO, J. Antiparasitic hybrids of *Cinchona* alkaloids and bile acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 66, pp. 355–363, 2013.

LIMA, A.A.N.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SILVA, J.L.; JÚNIOR, R.A.C.C.; LYRA, M.A.M.; ROLIM-NETO, P.J. Development of dissolution method for benznidazole tablets . **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, pp.2196-2199, 2009.

LIRA, M.C.B. **Complexo de inclusão Ácido Úsnico: β Ciclodextrina: Preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós graduação da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007.

LIU, J.; QIU, L.; GAO, J.; JIN, Y. Preparation: characterization and in vivo evaluation of formulation of baicalein with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm**. V.312, pp.137–143, 2006.

LIU, M.; CAO, W.; SUN, Y.; HE, Z. Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of repaglinide with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**. v.477, pp. 159–166, 2014.

LOFTOSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications: Historical Perspectives. **Int. J. Pharm**. v. 329, p.1-11, 2007.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

LOUIZ, S.; LABIADH, H.; ABDERRAHIM, R. Synthesis and spectroscopy studies of the inclusion complex of 3-amino-5-methyl pyrazole with beta-cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.134, pp.276–282, 2015.

LUKE, D. R.; TOMASZEWSKI, K.; DAMLE, B.; SCHLAMM, H. T. Review of the basic and clinical pharmacology of sulfobutylether-beta-cyclodextrin (SB β CD). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.8, pp. 3291–3301, 2010.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D. A. F. SOARES-SOBRINHO, J. L., ROLIM-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v.31, n.2. pp.117-124, 2010.

MA, S.X.; CHEN, W.; YANG, X.-D.; ZHANG, N.; WANG, S.-J.; LIU, L.; YANG, L.-J. Alpinetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V.67, pp.193–200, 2012.

MABUCHI, N.; NGOA, M. Controlled release powdered flavour preparations and confectioneries containing preparations. **Japanese Patent** . 128,638, 2001.

MAGARIÑOS, J.C; FERNÁNDEZ, C.; TROVE-BLOMBERG, M. FREYSDOTTIR, J. Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause modify the maturation of human dendritic cells and their ability to stimulate allogeneic CD4⁺ T cells. **International Immunopharmacology**. Vol 16, Pages 79–84, 2013.

MARINHO, S.R.M. **Função dos Alcalóides Indólicos Monoterpenóides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2001.

MARQUES, M.E.T.; COSTA, J.P.C. **Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. Belém: EMBRAPACPATU, 4 p. (Recomendações Básicas, 27); 1994.

MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.H.Y.; SOUZA, J. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Quim. nova**, v. 33, n. 8, pp.1714-1719, 2010.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

MEDEIROS, G.C.R. **Determinação espectrofotométrica do pKa e desenvolvimento de dispersões sólidas da nova entidade química LPSF/FZ4: um promissor agente esquistossomicida.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MENDONÇA, C.M.S.; LIMA, I.P.B.; ARAGÃO, C.F.S.; GOMES, A.P.B. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** . v.115, n.3, pp. 2277-2285, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Informe Técnico Institucional, **Rev Saúde Pública**. v44, n.1, pp.200, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas da Saúde. **Guia para o Controle da Hanseníase.** 2002.

MIURA, L.M.C.V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistossoma e sialagoga.** Dissertação (Mestrado em Ciência animal) Pós Graduação de Ciência animal, Universidade Federal do Piauí, Terezina, 2009.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, pp. 105-111, 2001.

MOYANO, M.A.; BROUSSALIS, A.M.; SEGALL, A.I. Thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipients. **J Therm Anal Calorim**, v. 99, p. 631–63, 2010.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** . v.101, pp.238–250, 2014.

NAIDU, N. B.; CHOWDARY, K. P.; MURTHY, K. V.; SATYANARAYANA, V., Hayman, A. R., & Becket, G. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam–cyclodextrin binary systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.35, n.1, pp.75–86, 2004.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

NETO, P. J. Study of stability and drug-excipient compatibility of diethylcarbamazine citrate. **J Therm Anal Calorim.** V.111, pp. 2179–2186, 2013.

NICHOLS, G. Applications of cathodoluminescence spectroscopy and imaging in the characterization of pharmaceutical materials. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, pp. 19-42, 2012.

OFOEFULE, S.I.; UDEOGARANYA, P.O.; OKONTA, J.M. Prediction of in vivo bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE). **Boll. Chim. Farm.** v. 140, n.3, pp. 187-191, 2001.

OLIVA, A.; LLABRE, M.; FARIÑA, B.J. Data analysis in stability studies of biopharmaceutical drugs with isothermal and non-isothermal assays. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 5, 2011.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, v. XY, n. 00, pp.1-7, 2011.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M. A.; TORRADO, J. J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; ALUNDA, J. M. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v.30, pp. 325–329, 2007.

OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.38, n.11, pp.1881-1886, 1965.

OZAWA, T. Thermal analysis: review and prospect. **Thermochimica Acta**, v.355, p.35-42, 2000.

PAULA, W. X. ; SINISTERRA, R. D.; SANTOS, R. A. S. ; BERALDO, H. O. A Química Inorgânica no Planejamento de Fármacos Usados no Controle da Hipertensão. **Química Nova**, v. 6, p. 19-23, 2005.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

PEREIRA, A.V., GARABELI, A.A., SCHUNEMANN, D., BORCK, P.C. Determinação da constante de dissociação (k_a) do captopril e da nimesulida – experimentos de química analítica para o curso de farmácia. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 9, 1656-1660, 2011.

PÉREZ, R.M. VARGAS, R. MARTÍNEZ, F.J. GARCÍA, E.V. HERNÁNDEZ, B. Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. **Ars Pharmaceutica**, v.44, n.1; pp.5-21, 2003.

PETKOV, V.; STANCHEVA, S. In vitro inhibition of Cyclic 3X, 5X-AMPC phosphodiesterase by a group of structural analogues of glaucine, **Acta Physiol. Pharmacol.** v.6, pp. 38–46, 1980.

PHADNIS, N.V.; CAVATUR, R.K.; SURYANARAYANAN, R. Identification drugs in pharmaceutical dosage forms by x-ray powder diffractometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, pp. 929-943, 1997.

PINHEIRO, C. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, **Brasil. Acta Bot. Bras.** [online]. vol.16, n.2, pp. 141-150, 2002.

PIRES, M.A.S. **Preparo de compostos de inclusão de hidroclorotiazida, pioglitazona e claritromicina em ciclodextrinas por diferentes técnicas: caracterização e estudos biológicos.** Tese (Doutorado em Química) Pós graduação em química. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

QIU, N.; CHENG, X.; WANG, G.; WANG, W.; WEN, J.; ZHANG, Y.; SONG, H.; MA, L.; WEI, Y.; PENG, A.; CHEN, L. Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and in vitro evaluation. **Carbohydrate Polymers**. v.101, pp. 623– 630, 2014.

RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Rev Bras Cienc Farm.** v.42, n.1, pp.59-68, 2006.

RASHEED, A.; AHOK, K.C.K.; SRAVANTHI, V.V.N.S.S. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. **Sci Pharm.** v.76, pp.567–598, 2008.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

RIBEIRO, A.; FIGUEIRAS, A; SANTOS, D; VEIGA, F. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1102-1109, 2008.

ROBERTS, M.F.; WINK, M. A short history of alkaloids. **In Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications**, ed. Roberts and Wink, Plenum Press, New York.1998.

RODANTE, F.; CATALANI, G.; VECCHIO, S. Kinetic analysis of single or multi-step decomposition processes - Limits introduced by statistical analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, pp. 689-713, 2002.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Application of TA and kinetic study to compatibility and stability problems in some commercial drugs. Remarks on statistical data. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 66, n. 1, p. 155-178, 2001.

RODRIGUES, O.P.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.F.; MATOS, J.R.; Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, n. 24, pp. 383, 2005.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**.v. 24, n.3, pp.383-7, 2005.

RODRIGUEZ-PEREZ, A.I.; RODRIGUEZ-TENREIRO, C.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCEIRO, A.; TORRES-LABANDEIRA, J.J. Drug solubilization and delivery from cyclodextrin-pluronic aggregates. **J Nanosci Nanotechnol** . v.6, n.9, pp. 3179-86, 2006.

ROGÉRIO, A.P.; DORAB, C.L.; ANDRADE, E.L.; CHAVESA, L.F.C.S.; SENNA, E.L.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharm. Res.** v.61, n.4, pp.288-297, 2010.

ROLIM, L.A. **Obtenção tecnológica de forma farmacêutica associação em dose fixa para o tratamento da Filariose Linfática e estudos de Estabilidade Forçada dos Fármacos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Pós graduação em ciências farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

RUZ, V.; FROYEN, M.; BUSSON, R.; GONZALEZ, M.M.; BAUDEMPREZ, L.; MOOTER, G.V.D. Characterization and molecular modeling of the inclusion complexes of 2-(2-nitrovinyl) furan (G-0) with cyclodextrines. **International Journal of Pharmaceutics**. v.439, pp.275– 285, 2012.

SABÁ, R.T.; LAMEIRA, O.A.; LUZ, J.M.Q.; GOMES, A.P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, pp. 106-109, 2002.

SAENGER, W. Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry. **Angewandte Chemie International Edition in English**. v.19, n.5, pp 344–362, 1980.

SALVIO NETO, H.; NOVAK, C.; MATOS, J.R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. **Journal of thermal Analysis and Calorimetry**, v.97, n.1, p.367-374, 2009.

SANTOS, A. P.; MORENO P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological Activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.40, n. 2, 2004.

SANTOS, F. L. A.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, K. E. R.; ROLIM, L. A.; GOMES, T. C. B. L.; FERRAZ, L. R. M.; LIMA, A. A. N.; SOARES-SOBINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, vol. 33, n.1, p. 37-47, 2012.

SAWAYA, A. C. H. F.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genet Resour Crop Evol**, v. 58, p. 471-480, 2011.

SCHARDINGER F. Uber Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie uber einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nahrlosungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus St€arke, **Untersuch. Nahr. u. Genussm**, vol. 6. Z pp. 865e80, 1903.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SERRA, C.H.R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 43, n. 1, 2007.

SILVA, V.G.; SILVA, R.O.; DAMASCENO, S.R.B.; CARVALHO, N.S.; PRUDÊNCIO, R.S.; ARAGÃO, K.S.; GUIMARÃES, M.A.; CAMPOS, S.A.; VÉRAS, L.M.C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J.R.S.A.; BARBOSA, A.L.R.; MEDEIROS, J.V.R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*, *Journal of Natural Products*, **J. Nat. Prod.**, v.76, pp,1071–1077, 2013.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S.N. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.2 n.3, pp. 171-183, 2010.

SKORUPA, L.A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae)**. Tese (Doutorado em botânica), Universidade de São Paulo, 1996.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THIES, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para o desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharm. Technol.** n. 1, pp. 34-43, 1997.

SOARES, M. F. L. **Desenvolvimento tecnológico de comprimido antirretroviral em associação dose fixa de zidovudina, lamivudina e efavirenz**. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SANTOS, F.L.A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; LIMA, A.A.N.; NUNES, L.C.C.; SOARES, M.F.R.; ROLIM-NETO, O.J.; TORRES-LABANDEIRA, J.J. .Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v.89, pp.323– 330. 2012.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; LABANDEIRA, J.J.T.; ALVES, L.D.S.; ROLIM-NETO, P.J. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, pp. 1534-1538, 2011.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; LOPES, P.Q.; CORREIA, L.P.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O.; ROLIM-NETO, P.J. A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, pp. 1391-1396, 2010.

SOVISI, M.R., HOSSEINE, S.G. Studies on the thermal behavior and decomposition kinetic of drugs cetirizine and simvastatin. **J Therm Anal Calorim**, v. 111, p. 2143–2148, 2013.

SOVIZI, M.R. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. **J Therm Anal Calorim**. v.102, pp. 285-289, 2010.

SPAMER, E.; MULLER, D.G.; WESSELS, P.L.W.; VENTER, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Sci**, v.16, n.4-5, pp.247-253, 2002.

SPRICIGO, R., BOTELHO, K.C.A., CONSIGLIERI, V.O., SERRA, C.H.R. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Lat Am J Pharm**. v.27 n.5, pp.645-53, 2008.

STEINMANN P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v.6, pp. 411–425, 2006.

STELLA, V.J., RAJEWSKI, R.A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. **Pharm Res**, v.14, pp.556–567, 1997.

STULZER, H.K.; RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.M.; MATOS, J.S.R.; SILVA, M.A.S.; Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations. **J Therm Anal Calorim**. v.91, pp.323–8, 2008.

SYKULA-ZAJA, A.; LODUGA-CHRUSCINSKA, E.; PALECZ, B.; DINNEBIIER, R. E.; GRIESSER, U. J.; NIEDERWANGER, V. Thermal and X-ray analysis of racemic bupivacaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 105, pp. 1031–1036, 2011.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

TAM, K.Y.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study, **Anal. Chim. Acta.** v. 434, p. 157-167, 2001.

TAKAHASHI, S.; TSUKAGOSHI, M.; SATO, T.; KITAHARA, Y.; FUJII, T. Thermogravimetry of the thermal degradation of Japanese lacquer (urushi) films. **J Therm Anal Calorim**, v.111, pp. 685–688, 2013.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **USP 34**, Rockville, v.1 , 2011.

TIȚA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIȚA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 221– 227, 2011.

TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; RUSU, G.; TITA, D. Thermal stability of ibuprofen.kinetic study under non-isothermal conditions. **Rev. Roum. Chim.** v.55, n.9, pp. 553-558, 2010.

TIȚA, B.; MARIAN, E.; TIȚA, D.; VLASE, G.; DOCA, N.; VLASE T. Comparative kinetic study of decomposition of some diazepine derivatives under isothermal and non-isothermal conditions. **J Therm Anal Calorim.** v.94, pp. 447-452, 2008.

TROTТА, F.; ZANETTI, M.; CAMINO G. “Thermal degradation of cyclodextrins,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 69, no. 3, pp. 373–379, 2000.

VECCHIO, S.; RODANTE, F.; TOMASSETTI, M. Thermal stability of disodium and calcium phosphomycin and the effects of the excipients evaluated by thermal analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 1111-1123, 2001.

VELLOSO, F.T.; FERRAZ, R.S.; LIRA, A.A.M.; SANTANA, D.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato e quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** vol. 45, n. 1, 2009.

VENTURA, C.A.; GIANNONE I.; PAOLINO, D.; PISTARA, V.; CORSARO, A.; PUGLISI G. Preparation of celecoxib-dimethyl-betacyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro permeation study. **Eur J Med Chem.** v.40, n.7, pp. 624-31, 2005.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

VERAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **Plos one**, v. 8, n. 6, p. 1-11, 2013.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, pp. 2051-2058, 2012.

VIEIRA, A. C. Q. M.; MARQUES G. S.; MELO C. M.; SILVA K. E. R.; ROLIM, L. A. ROLIM-NETO P. J. Physical–chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients **J Therm Anal Calorim** DOI 10.1007/s10973-013-3358-y, 2013.

VILLIERS A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. **Compt Rend Acad Sci**. v.112, pp.536-8, 1891.

VÖLGYI, R.; RUIZ, K.; BOX, J.; COMER, E.; BOSCH, K.; TAK'ACS-NOVÁK. Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system Gergely, **Analytica Chimica Acta**, v. 583, p. 418–428, 2007.

WILLIAMS III, R.O.; MAHAGUNA, V.; SRIWONGJANYA, M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.46 pp. 355–360, 1998.

XU, C.; TANG, Y.; HU, W.; TIAN, R.; JIA, Y.; DENG, P.; ZHANG, L. Investigation of inclusion complex of honokiol with sulfobutyl ether- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers** v.113, pp. 9–15, 2014.

YANG, B.; LIN, J.; CHEN, Y.; LIU, Y. Artemether/hydroxypropyl β -cyclodextrin host–guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n.17, pp.6311–6317, 2009.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

YANG, L.J.; MA, S.X.; ZHOU, S.Y.; CHEN, W.; YUAN, M.W.; YIN, Y.Q.; YANG, X.D. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative. **Carbohydrate Polymers**, v.98, pp. 861– 869, 2013.

ZHANG, W.; CHEN, M.; DIAO, G. Preparation and electrochemical behavior of water-soluble inclusion complex of ferrocene with β -cyclodextrin polymer. **Electrochimica Acta**, v.56, n.14, pp. 5129–5136, 2011.

ZHANG, W.; CHEN, M.; ZHA, B.; DIAO, G. Correlation of polymer-like solution behaviors with electrospun fiber formation of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and the adsorption study on the fiber. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.14, n.27, pp. 9729–9737, 2012.

ZHANG, W.; GONG, X.; CAI, Y.; ZHANG, C.; YU, X.; FAN, J.; DIAO, G. Investigation of water-soluble inclusion complex of hypericin with β -cyclodextrin polymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, pp. 366– 370, 2013a.

ZHANG, Y.; REN, K.; HE, Z.; LI, H.; CHEN, T.; LEI, Y.; XIA, S.; HE, G.; XIE, Y.; XHENG, Y.; SONG, X. Development of inclusion complex of brinzolamide with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v.98, pp. 638– 643, 2013b.

ZOELLER, T.; DRESSMAN, J.B.; KLEIN, S. Application of a ternary HP- β -CD-complex approach to improve the dissolution performance of a poorly soluble weak acid under biorelevant conditions. **Int. J. Pharm.** v. 430, pp.176–183, 2012.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.