



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

CYBELLE ALVES TAVARES

**ONCOCALIXONA A: VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA POR
CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS E ESTUDO
TERMODINÂMICO DA INTERAÇÃO COM CICLODEXTRINAS ATRAVÉS DE
CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

Recife

2019

CYBELLE ALVES TAVARES

**ONCOCALIXONA A: VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA POR
CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS E ESTUDO
TERMODINÂMICO DA INTERAÇÃO COM CICLODEXTRINAS ATRAVÉS DE
CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle de Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Recife

2019

Catálogo na fonte:
bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

T231o	Tavares, Cybelle Alves. Oncocalixona A: validação de uma metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação em diferentes meios e estudo termodinâmico da interação com ciclodextrinas através de calorimetria de titulação isotérmica/ Cybelle Alves Tavares. – Recife: o autor, 2019. 143 f.; il. Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Inclui referências e apêndices. 1. Estudos de validação. 2. Óleo de soja. 3. Oncocalixona A. 4. Solubilidade. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orientador). II. Título. 615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 115)
-------	--

CYBELLE ALVES TAVARES

**ONCOCALIXONA A: VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA POR
CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS E ESTUDO
TERMODINÂMICO DA INTERAÇÃO COM CICLODEXTRINAS ATRAVÉS DE
CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 27 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Filipe da Silva Lima (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. João Bosco da Silva Paraíso (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho:

Primeiramente a Deus, pois sem ele, nada seria possível.

Aos meus pais, pelo esforço, dedicação e motivação, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Ao meu esposo pela paciência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Nesse período aprendi que uma tese ou qualquer outro trabalho é uma extensão da vida do autor. Por esse motivo, agradeço sincera e profundamente a todas as pessoas que muito me encorajaram e me ajudaram a produzir mais uma coisa de valor na minha vida.

À Prof^a Dr^a Nereide Stela Santos Magalhães, minha orientadora, pela confiança em mim depositada. Agradeço por ter acreditado no meu potencial, por todas as oportunidades que me deu e pela compreensão ao longo desta labuta.

Ao Prof^o Dr. Rafael Matos Ximenes, meu coorientador, pela assistência e apoio dedicado durante este trabalho.

Ao Pesquisador Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior, e também amigo, pela imensurável contribuição na elaboração desta tese através da sua experiência como responsável por estudos que foram determinantes para a consolidação desta etapa da minha vida. Pelo acompanhamento durante os experimentos, dando suporte no conhecimento prático e teórico vivenciado ao longo desses quatro anos. Para mim foi um grande prazer poder trabalhar ao seu lado. Tornou-se também um amigo especial que ganhei durante essa trajetória.

Aos colegas de laboratório que tornaram-se amigos mais que espécies; a vocês Daniele Rocha, Marília Evellyn e Wanderval Oliveira, que contribuíram profundamente com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso, minha admiração e agradecimento. Um agradecimento especial a Daniele Rocha, sempre presente, seja na bancada experimental, nas vias de comunicação ou em orações, me incentivando.

À pesquisadora Milena por toda ajuda empenhada e disponibilidade constante.

Aos colegas dos grupos Sistema de Liberação Controlada (SLC) do Departamento de Bioquímica do LIKA/UFPE e Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada (LEA) do Departamento de Antibióticos da UFPE que sempre deram suporte para que tudo funcionasse durante a fase experimental deste projeto.

À professora Dr^a Otília Deusdênia Loiola Pessoa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, pela disponibilização da molécula oncocalexona A para estudos nesta tese.

Ao professor Dr. Alejandro Pedro Ayala, pela disponibilidade para a realização das análises de FTIR e análises térmicas.

Ao LIKA e ao Departamento de Química Fundamental (DQF) pela disponibilidade da infraestrutura e suporte dado a este trabalho.

Ao CNPq pelo incentivo e auxílio financeiro ao longo deste doutorado.

A todos os outros colegas e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

"Cultivar estados mentais positivos como a generosidade e a compaixão decididamente conduz a melhor saúde mental e a felicidade."
(DALAI-LAMA, 2000, p. 56)

RESUMO

Oncocalixona A (onco A) é uma quinona natural, isolada da cerne da *Cordia oncocalyx*, que possui propriedades farmacológicas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral. Assim, a onco A mostra-se promissora para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Contudo, essa molécula apresenta uma diminuição na sua eficácia após administração por via oral. Dessa forma, o conhecimento de suas propriedades físico-químicas é essencial para a produção de novos medicamentos. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de onco A em diferentes meios, seguido da aplicação do método para determinar sua solubilidade e coeficiente de partição. Bem como, estudar as interações entre a onco A com diferentes ciclodextrinas (CDs) (β -, HP- β -, SBE- β -, γ - e HP- γ -CD) por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A validação foi realizada de acordo com as diretrizes da ICH para produtos farmacêuticos. A solubilidade da onco A foi determinada em água deionizada, soluções tampão pH=5,5, 7,0, 9,0, assim como tampões com pHs = 2,8 e 6,8, que simulam os fluidos gástricos e intestinais, respectivamente, bem como em óleos: copaíba, soja e triglicerídeos de cadeia média (TCM). Determinou-se o coeficiente de partição de onco A entre n-octanol/água e óleos/água. Parâmetros termodinâmicos envolvidos na formação do complexo de inclusão foram determinados através de ITC e o complexo onco A:HP- γ -CD foi caracterizado por FTIR, ^1H NMR, DSC, TG e MEV. As curvas padrão da onco A foram reproduzíveis com inclinação de linearidade estatisticamente diferente de zero e resíduos com distribuição homocedástica. O método proposto permitiu a determinação do limite de quantificação e detecção, LD e LQ, respectivamente. Além disso, o desvio padrão relativo (DPR) da média das determinações foi inferior a 5% para exatidão e precisão. Em adição, o método foi resistente a pequenas variações dos parâmetros analíticos, mostrando-se robusto. A solubilidade foi maior em água ($759,6 \pm 10,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$), soluções tampão pH = 5,5 ($783,1 \pm 38,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 7 ($880,9 \pm 27,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 9 ($845,0 \pm 10,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 2,8 ($763,2 \pm 12,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 6,8 ($870,5 \pm 24,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), do que nos óleos de soja ($461,7 \pm 8,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), copaíba ($434,8 \pm 15,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TCM ($406,9 \pm 5,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A onco A apresentou $\log P < 1$. O doseamento de onco A nas nanocápsulas não revestidas e revestidas com quitosana foi de 98,8% e 99,6%, respectivamente. Os estudos de ITC, mostraram que a onco A interage mais favoravelmente com HP- γ -CD ($N = 1,760 \pm 0,01$ e $K = 3175 \pm 295 \text{ M}^{-1}$) com a energia livre de Gibbs negativa ($\Delta G = -19,98 \text{ kJ.mol}^{-1}$). A formação do complexo de inclusão foi dirigida por entropia ($T\Delta S = 19,54 \text{ kJ.mol}^{-1}$) e confirmada por FTIR, análises

térmicas, $^1\text{HNMR}$ e MEV. Em conclusão, um método de CLAE-UV para quantificar onco A foi desenvolvido, validado e aplicado para determinar a solubilidade, em soluções aquosas com diferentes pHs e óleos, bem como seu coeficiente de partição e quantificação em nanocápsulas. Podendo ser proposto para obter uma análise de controle de qualidade de diferentes produtos contendo onco A. O método mostrou ser de baixo custo usando uma coluna de C-18 e uma fase móvel composta por água acidificada/Acetonitrila (70:30) e um fluxo de 0,7 mL/min. Adicionalmente, os parâmetros termodinâmicos sugerem a formação de um complexo de inclusão estável oncoA:HP- γ -CD.

Palavres-chave: Estudos de validação. Óleo de soja. Oncocalixona A. Solubilidade. Termodinâmica.

ABSTRACT

Oncocalixone A (onco A) is a natural quinone isolated from the core of *Cordia oncocalyx* which has pharmacological properties such as antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor. Thus, the onco A seems to be promising for the development of new drug delivery systems. However, this molecule has a decrease in its efficacy after oral administration. Thereby, knowing its physicochemical properties is essential for the production of new drugs. The goals of this study were to develop and validate a method of high efficiency liquid chromatography (HPLC) for quantification of onco A in different conditions, followed by the application of the method to determine its solubility and partition coefficient. As well as to study the interactions between the onco A with different cyclodextrins (CDs) (β -, HP- β -, SBE- β -, γ - and HP- γ -CD) by isothermal titration calorimetry (ITC). Validation was performed according to ICH guidelines for pharmaceuticals. The solubility of the onco A was determined in deionized water, buffer solutions pH = 5.5, 7.0, 9.0, and buffers with pHs = 2.8 and 6.8 which simulated gastric and intestinal fluids, respectively. It was also determined in oils: copaiba, soybean and medium chain triglycerides (TCM). The partition coefficient of onco A between n-octanol/water and oils/water were determined. Thermodynamic parameters involved in the formation of the inclusion complex were determined by ITC. The onco A: HP- γ -CD complex was characterized by FTIR, ^1H NMR, DSC, TG and MEV. Standard onco A curves were reproducible with linearity slope statistically different from zero and residues with homocedastic distribution. The proposed method allowed to determine the limit of detection and quantification, LOD and LOQ, respectively. Furthermore, the relative standard deviation (RSD) from the mean of the determinations was less than 5% for accuracy and precision. In addition, the method resisted to small changes at the analytical parameters, showing ruggedness. Solubility was higher in water ($759.6 \pm 10.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$), buffer solutions pH = 5.5 ($783.1 \pm 38.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 7 ($880.9 \pm 27.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 9 ($845.0 \pm 10.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 2.8 ($763.2 \pm 12.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pH = 6.8 ($870.5 \pm 24.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), than in soybean oils ($461.7 \pm 8.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), copaiba ($434.8 \pm 15.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and TCM ($406.9 \pm 5.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The onco A showed $\log P < 1$. The drug content of onco A on the uncoated and coated chitosan nanocapsules was 98.8% and 99.6%, respectively. The ITC studies showed that the onco A most favorably interacts with HP- γ -CD ($N = 1.760 \pm 0.01$ and $K = 3175 \pm 295 \text{ M}^{-1}$) with negative Gibbs-free energy ($\Delta G = -19.98 \text{ kJ.mol}^{-1}$). The formation of the inclusion complex was driven by entropy ($T\Delta S = 19.54 \text{ kJ.mol}^{-1}$) and confirmed by FTIR, thermal analyzes, ^1H NMR and MEV. These studies demonstrated that a simple and effective HPLC-UV method

was developed and validated to quantify onco A and that this method can be applied to determine the solubility in oils and aqueous solutions with different pHs, its partition coefficient and quantify it in nanocapsules. Therefore the method is able to be proposed to obtain a quality control analysis of different products containing onco A. The method was shown to be low cost, using a C-18 column and a mobile phase composed of acidified water/Acetonitrile (70:30) and a flow of 0.7 mL/min. Additionally, thermodynamic parameters suggest the formation of a stable inclusion complex onco A: HP- γ -CD.

Keywords: Validation studies. Soy oil. Oncocalixone A. Solubility. Thermodynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Esboço geral da via biossintética de metabólitos secundários em plantas...	24
Figura 2 -	Vários fatores que afetam a síntese de metabólitos secundários em plantas.....	26
Figura 3 -	Aspectos da planta de <i>Cordia oncocalyx</i> Allemão.....	28
Figura 4 -	Estrutura química do 1,4-benzoquinona e p-benzoquinina.....	30
Figura 5 -	Estrutura química da oncocalixona.....	31
Figura 6 -	Representação de α -CD, β -CD e γ -CD e do aspecto truncado da CDs.....	34
Figura 7 -	Representação de uma CD e suas hidroxilas primárias e secundárias.....	35
Figura 8 -	Esquema de uma formação típica de um Complexo de Inclusão.....	39
Figura 9 -	Aparato da Colorimetria de Titulação Isotérmica.....	41
Figura 10 -	Dados de calorimetria de titulação isotérmica obtidos para a interação molécula-CD em água a 25 °C.....	42
Figura 11 -	Determinação gráfica da linearidade através de uma curva analítica.....	53
Figura 12 -	Diagrama esquemático da janela ou faixa terapêutica.....	60
Figura 13 -	Sistemas de Liberação Controlada.....	62
Figura 14 -	Sistemas de distribuição que podem ser usados para encapsular, proteger e distribuir componentes bioativos hidrofílicos.....	63
Figura 15 -	Estrutura da Membrana Mucosa.....	64
Figura 16 -	Mecanismo presumido do transporte paracelular de fármacos hidrofílicos para a corrente sanguínea usando nanopartículas revestidas de quitosana.....	66
Figura 17 -	Esquema do preparo das amostras para o estudo de solubilidade.....	73
Figura 18 -	Esquema de preparo das amostras para estudo do coeficiente partição.....	74
Figura 19 -	Estudo de ensaios de avaliação das interações moleculares por ITC.....	75
Figura 20 -	Esquema de obtenção do complexo de inclusão onco A: HP- γ -CD.....	77
Figura 21 -	Cromatograma típico da eluição da onco A.....	84
Figura 22 -	Cromatograma representativo da fase móvel.....	85
Figura 23 -	Cromatogramas representativos de onco A a 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes meios.....	86
Figura 24 -	Curva de Calibração da onco A.....	87
Figura 25 -	Distribuição dos resíduos obtidos a partir de três curvas padrão	

	independentes com concentrações variando de 0,5 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	88
Figura 26 -	Precisão Intermediária do método CLAE para quantificação da onco A...	90
Figura 27 -	Gráfico da superfície de resposta tridimensional do desvio padrão relativo das respostas da área do pico (A) e tempo de retenção (B), com fase móvel e taxa de fluxo com variáveis independentes.....	93
Figura 28 -	Solubilidade da onco A em diferentes solventes a 25 °C.....	95
Figura 29 -	Titulação calorimétrica de CDs com onco A a 25 °C: isoterma de calor de reação a partir da integração de dados brutos de injeções automáticas sequenciais de CDs (25 mM, exceto para β - CD = 15 mM) numa solução de onco A (1,31 mM) (A).....	101
Figura 30 -	Espectros FTIR da onco A; HP- γ -CD; mistura física e complexo de inclusão onco A:HP- γ -CD na proporção molar de 1:1.....	102
Figura 31 -	Análise térmica, DSC (A) e TG (B) do complexo de inclusão onco A:HP- γ -CD; mistura física (MF) na proporção molar de 1:1; HP- γ -CD e onco A.....	105
Figura 32 -	Aplicação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para caracterizar a onco A; HP- γ -CD; seus CI onco A:HP- γ -CD bem como a mistura física.....	107
Figura 33 -	Formulação de Microesferas de PLGA após a segunda lavagem (esquerda) e após a primeira lavagem (Direita).....	108
Figura 34 -	Micropartículas de Alginato dispersas em solução aquosa de CaCl_2	109
Figura 35 -	Dispersão de nanoesferas de PCL após o processo de Ultrafiltração.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividades biológicas da onco A.....	32
Tabela 2 -	Características e aplicações das CDs de derivados.....	36
Tabela 3 -	Condições cromatográficas do método de quantificação da onco A por CLAE acoplado a um detector de UV.....	84
Tabela 4 -	Exatidão do método de CLAE-UV para quantificação da onco A.....	89
Tabela 5 -	Análise da precisão intra-dia e inter-dia do método do CLAE-UV para a quantificação da onco A.....	90
Tabela 6 -	Fatores e níveis do planejamento experimental.....	92
Tabela 7 -	Solubilidade da onco A e o Coeficiente de Partição em diferentes fases.....	96
Tabela 8 -	Estequiometria (n), constante de ligação (k), entalpia (ΔH), entropia (ΔS), energia livre de Gibbs (ΔG) da onco A com as CDs a pH 7,0 de acordo com um modelo único de ligação.....	98
Tabela 9 -	Dados dos deslocamentos químicos (ppm) de RMN de 1H da HP- γ -CD e onco A no estado livre e no complexo de inclusão.....	104
Tabela 10 -	Características das nanocápsulas revestidas de quitosana.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Emulsão Água em Óleo
A/O/A	Emulsão Água/Óleo/Água
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD	Ciclodextrina
CG	Cromatografia Gasosa
CI	Complexo de Inclusão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DDS	<i>Drug Delivery System</i>
DM	Dinâmica Molecular
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DPPC	Dipalmitol-fosfatidilcolona
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
D ₂ O	Água Deuterada
EC	Eletroforese Capilar
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
GI	Gastrointestinal
GMP _C	Guanosina Mono Fosfato Cíclico
HP	Hidroxipropil
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Normatização e Qualidade Industrial
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
K	Constante de Afinidade
LD	Limite de Detecção
LIKA	Laboratório de Imutopatologia Keizo-Asami

logP	Coeficiente de Partição
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N	Estequiometria de Interação
NC	Nanocápsula
NCQT	Nanocápsula Revestida de Quitosana
NOE	Efeito Overhauser Nuclear
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser
Onco A	Oncocalixona A
PCL	Poli(e -caprolactona)
PDI	Índice de Polidispersão
PEG 4000	Polietilenoglicol 4000
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PZ	Potencial Zeta
R	Coeficiente de Correlação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	Efeito Nuclear Overhauser de Estrutura Rotacional
SLC	Sistema de Liberação Controlada
TCM	Triglicerídeos de Cadeias Médias
TG	Termogravimetria
TGA	Análise Termogravimétrica
TGI	Trato Gastrointestinal
Tr	Tempo de Retenção
USP	<i>United States Pharmacopeial</i>
UV	Ultravioleta Visível
WAXD	Difração de Raios X em Ângulo Amplo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
3.1	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS.....	24
3.2	PAU BRANCO (<i>Cordia oncocalix</i> Allemão)	26
3.3	ONCOCALIXONA A: UMA QUINONA COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	30
3.3.1	Propriedades Físico-químicas.....	30
3.3.2	Propriedades Biológicas da Oncocalixona A.....	32
3.4	CICLODEXTRINAS.....	34
3.4.1	Ciclodextrinas na Indústria Farmacêutica.....	38
3.4.2	Estudo de Caracterização de Complexos de Inclusão.....	40
3.4.2.1	Microcalorimetria de Titulação Isotérmica.....	40
3.4.3.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	44
3.4.2.3	Ressonância Magnética Nuclear.....	45
3.4.2.4	Calorimetria Diferencial de Varredura.....	46
3.4.2.5	Análise Termogravimétrica.....	47
3.4.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
3.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS.....	49
3.5.1	Seletividade.....	51
3.5.2	Linearidade.....	51
3.5.3	Exatidão.....	53
3.5.4	Precisão.....	54
3.5.4.1	Repetibilidade.....	55
3.5.4.2	Precisão Intermediária.....	55
3.5.4.3	Reprodutibilidade.....	55
3.5.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	56

3.5.6	Robustez.....	58
3.6	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	59
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1	MATERIAL.....	67
4.1.1	Matérias-primas.....	67
4.1.2	Aparelhos e Equipamentos.....	68
4.2	MÉTODOS.....	69
4.2.1	Desenvolvimento do Método Analítico por CLAE para Quantificar a Onco A.....	69
4.2.1.1	Condições Cromatográficas.....	69
4.2.1.2	Preparo da Amostra.....	70
4.2.2	Validação do Método Desenvolvido.....	70
4.2.2.1	Seletividade.....	70
4.2.2.2	Linearidade.....	71
4.2.2.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	71
4.2.2.4	Efeito Residual.....	71
4.2.2.5	Exatidão.....	71
4.2.2.6	Precisão.....	72
4.2.2.7	Robustez.....	72
4.2.3	Aplicabilidade do Método Validado.....	73
4.2.3.1	Determinação da Solubilidade da Oncocalixona A.....	73
4.2.3.2	Determinação do Coeficiente de Partição da Oncocalixona A.....	74
4.2.4	Estudo de Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	75
4.2.5	Preparo do Complexo de Inclusão Onco A:HP-γ-CD.....	76
4.2.6	Caracterização do Complexo de Inclusão Onco A:HP-γ-CD.....	77
4.2.6.1	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	77
4.2.6.2	Ressonância Magnética Nuclear.....	77
4.2.6.3	Análise Térmica.....	78
4.2.6.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	78
4.2.7	Preparo dos Sistemas de Liberação de Fármacos Contendo a Onco A.....	78
4.2.7.1	Microesferas de PLGA.....	78
4.2.7.2	Micropartículas de Alginato.....	79

4.2.7.3	Nanoesferas de PCL.....	79
4.2.7.4	Nanocápsulas de PCL Revestidas com Quitosana.....	80
4.2.8	Determinação da Eficiência de Encapsulação da Onco A em nanocápsulas.....	81
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
6.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-UV...	83
6.1.1	Seletividade.....	85
6.1.2	Linearidade.....	87
6.1.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	88
6.1.4	Efeito Residual.....	88
6.1.5	Exatidão.....	89
6.1.6	Precisão.....	89
6.1.7	Robustez.....	91
6.2	APLICAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-UV DESENVOLVIDO.....	94
6.2.1	Estudo de Solubilidade.....	94
6.2.2	Coeficiente de Partição.....	95
6.3	CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.....	97
6.4	CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ONCO A:HP- Γ -CD.....	102
6.4.1	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier....	102
6.4.2	Ressonância Magnética Nuclear.....	103
6.4.3	Análise Térmica.....	105
6.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	106
6.5	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	107
6.5.1	Microesferas de PLGA.....	107
6.5.2	Micropartículas de Alginato.....	108
6.5.3	Nanoesferas de PCL.....	110
6.5.4	Nanocapsulas de PCL Revestidas com Quitosana.....	111
6.5.5	Eficiência de Encapsulação da Onco A em Nanocápsulas.....	111
7	CONCLUSÃO.....	113
8	PERSPECTIVAS.....	114

REFERÊNCIAS.....	115
APÊNDICE A - SETE CURVAS PADRÃO INDEPENDENTES COM CONCENTRAÇÕES DE 0,5 A 20 MG.ML⁻¹ DE ONCO A...	139
APÊNDICE B - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DA ONCOALIXONA A.....	140
APÊNDICE C - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DA HP-Γ-CD.....	141
APÊNDICE D - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹H DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ONCO A:HP-Γ-CD.....	142

1 INTRODUÇÃO

A onco A (onco A), uma quinona natural, possui uma série de propriedades biológicas, tais como antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2003; BOYE *et al.*, 2013), citotóxica frente a linhagens cancerosas (LEVYA *et al.*, 2000; PESSOA *et al.*, 2004); antibacteriana (LLAYAJARA *et al.*, 2014); inibidora de agregação plaquetária (FERREIRA *et al.*, 2008); hipoglicemiante (SIVAGNANAN; KALAIVANANAN; RAJAMANICKAM, 2013); antitumoral (BARRETO *et al.*, 2013); Leishmanicida (VIANA *et al.*, 2015); inibidora de contração neurogênica (MATOS *et al.*, 2017); analgésica e anti-inflamatória (FERREIRA *et al.*, 2004; LLAYAJARA *et al.*, 2014). Assim, a onco A apresenta-se promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos, e o conhecimento de suas propriedades físico-químicas é essencial para produzir uma forma de dosagem farmacêutica.

A ação anti-inflamatória e analgésica da onco A foi reportada por Ferreira *et al.* (2004). Entretanto, observou-se que após a administração oral do referido composto, houve uma diminuição na atividade anti-inflamatória, sugerindo baixa biodisponibilidade da quinona (FERREIRA *et al.*, 2004). As propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, coeficiente de partição e pKa podem influenciar sob diferentes formas nos parâmetros farmacocinéticos da molécula e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade após administração oral (MICHELETTI *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010).

As ciclodextrinas (CDs) representam uma abordagem terapêutica promissora para aumentar a disponibilidade de onco A. Na indústria farmacêutica, as CDs são usadas devido à sua capacidade de formar complexos de inclusão, incrementando a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de moléculas bioativas (DINAR *et al.*, 2014; PINHO *et al.*, 2014), aumentar dissolução e estabilidade físico-química, melhorar a vida útil, modificar o perfil e o tempo de liberação dos fármacos (SALÚSTIO *et al.*, 2011; ADEOYE; CABRAL-MARQUES, 2017; CONCEIÇÃO *et al.*, 2018). As CDs são capazes de aumentar a permeabilidade do fármaco através de barreiras biológicas, sem causar alterações permanentes nas membranas, modificando assim suas propriedades físico-químicas e comportamento *in vivo* (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; LOFTSSON; MASSON, 2001; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

O primeiro passo na avaliação físico-química de um composto é determinar sua solubilidade. Essa propriedade da molécula é crucial para projetar um produto farmacêutico, pois afeta diretamente a formulação, influenciando no perfil farmacocinético e, conseqüentemente, na eficácia do próprio composto (DI; KERNS; CARTER, 2009). Além

disso, é possível estimar a biodisponibilidade do fármaco através da determinação de sua capacidade de atravessar as membranas celulares, a qual é avaliada por meio do coeficiente de partição do fármaco. Este parâmetro informa sobre lipofilia da molécula e é um dos descritores mais relevantes aplicados no estudo da absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de fármacos (KERNS; DI, 2008; SHARAPOVA *et al.*, 2017).

Diante do exposto, primeiramente a determinação das propriedades físico-químicas tais como a solubilidade e coeficiente de partição do onco A, bem com o desenvolvimento e validação de um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que possa se aplicar na determinação desses parâmetros, é imprescindível para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que a CLAE é uma técnica versátil para a separação de produtos naturais em diferentes matrizes (WOLFENDER, 2009).

Complementando estudos físico-químicos de moléculas candidatas a fármacos, algumas pesquisas demonstram melhorias na determinação das interações entre essas moléculas hóspedes e ciclodextrinas nos respectivos complexos de inclusão formados (PAULA *et al.*, 2012; AGNES *et al.*, 2017; XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é atualmente considerado um método mais importante para a caracterização dos mecanismos de interação de CDs com fármacos (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012; NARAYANAN *et al.*, 2017). Através de estudos de ITC é possível determinar constantes de associação e estequiometria de moléculas interagentes em soluções aquosas, com base na medição de mudanças em seus parâmetros termodinâmicos, tais como a variação de entalpia (ΔH), que reflete o calor liberado ou absorvido durante a interação. Além disso, a entropia (ΔS) e a energia livre de Gibbs do processo (ΔG) (BOUCHEMAL *et al.*, 2009; SEGURA-SANCHEZ *et al.*, 2009; SAJEESH *et al.*, 2010; MAZZAFERRO *et al.*, 2011; NARAYAN *et al.*, 2017).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização físico-química da onco A e complementar os estudos de caracterização através de estudos de ITC entre onco A e diferentes CDs para a obtenção de complexos de inclusão, no intuito de otimizar a encapsulação da molécula em sistemas de liberação controlada com propriedades mucoadesivas para administração por via oral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a onco A dos ponto de vista físico-químico e em complexo de inclusão com ciclodextrinas para aplicação da molécula em sistemas de liberação controlada para administração por via oral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver e validar um método de quantificação da onco A por CLAE;
- ✓ Determinar a solubilidade da onco A em soluções aquosas com diferentes pHs e óleos;
- ✓ Determinar o coeficiente de partição experimental da onco A, em óleos vegetais e triglicerídeos de cadeia média;
- ✓ Realizar estudos de calorimetria de titulação isotérmica entre a onco A e diferentes tipos de ciclodextrinas;
- ✓ Obter complexos de inclusão da onco A com ciclodextrinas;
- ✓ Caracterizar os complexos de inclusão através de ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho, análises térmicas e microscopia eletrônica de varredura.

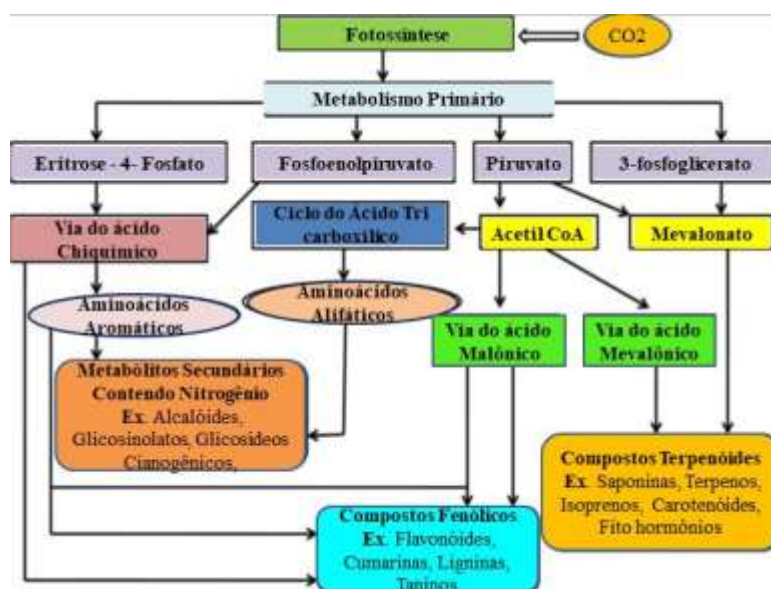
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

As plantas enfrentam vários oponentes em sistemas naturais e, portanto, possuem uma defesa inumerável e evoluíram com múltiplos mecanismos de resistências, através dos quais são capazes de lidar com vários tipos de estresse biótico e abiótico (BALLHORN *et al.*, 2009). As plantas se defendem produzindo alguns compostos de natureza química diversa chamados como metabólitos secundários, que são reconhecidos como compostos que são essenciais para a aclimação da planta e defesa, mas não têm papel fundamental na continuação dos seus processos vitais. Quase 100.000 moléculas de metabólitos secundários foram identificadas com peso molecular inferior a 150 kDa e produção inferior a 1% do peso da matéria seca (OKSMAN-CALDENTY; INZÉ, 2004).

Os metabólitos secundários também contribuem para os odores, sabores, toxinas e cores naturais específicos das plantas (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011), além de fontes exclusivas de aditivos alimentares, sabores e substâncias farmacologicamente ativas (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Com base na via biossintética (Figura 1), os metabólitos secundários de plantas são classificados em três grupos principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (BOURGAUD *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2011).

Figura 1 - Esboço geral da via biossintética de metabólitos secundários em plantas.



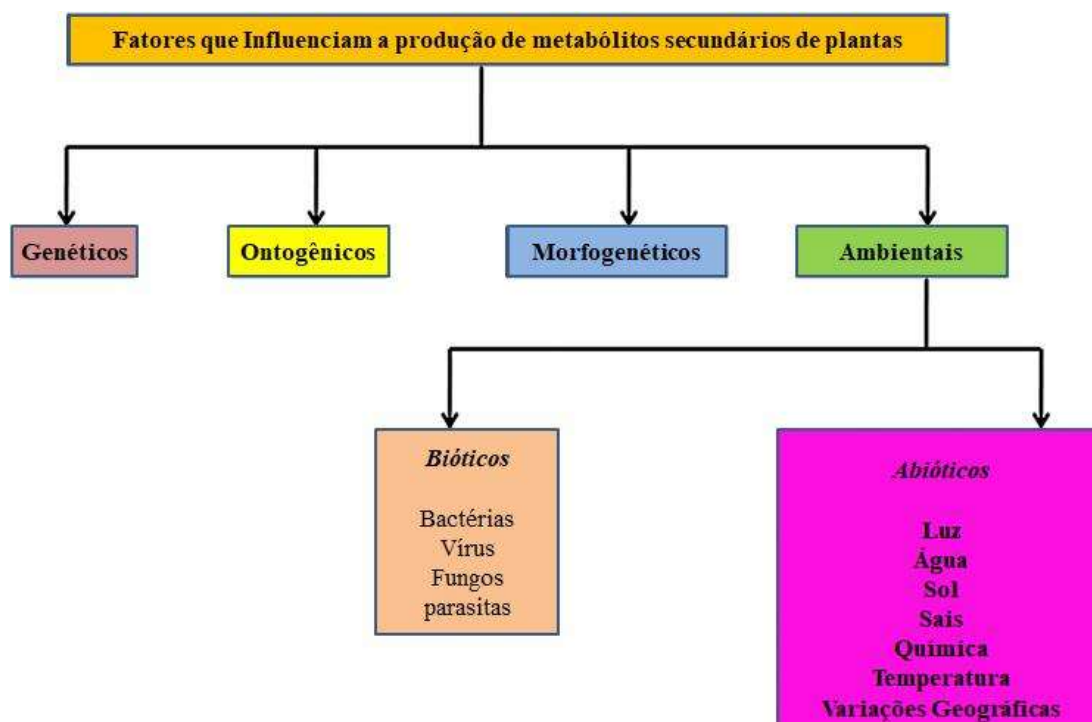
Fonte: Adaptado de Verma e Shukla (2015).

As concentrações dos metabólitos nas plantas são afetadas por vários fatores abióticos como temperatura, seca, salinidade, sazonalidade, ritmo circadiano, altitude, luz, radiação UV, íons metálicos, deficiências de nutrientes, etc. (GOUVEA *et al.*, 2012). Além disso, a concentração de metabólitos secundários nas plantas também depende das condições de crescimento e vias metabólicas relacionadas (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

A indução da biossíntese de metabólitos secundários de plantas e sua alta concentração também é dependente da resposta ao ataque de patógenos (fatores bióticos) para proporcionar defesa as plantas hospedeiras. A biossíntese e a concentração desses metabólitos secundários afetados por diferentes fatores foram descritas por vários estudos (BROUN *et al.*, 2006; GOUVEA *et al.*, 2012; VERMA; SHUKLA, 2015). Metabólitos como compostos fenólicos, por exemplo, apresentam variação em diferentes níveis genéticos, fisiológicos e de desenvolvimento em resposta a fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes e intensidade de luz, etc. (KOTILAINEN *et al.*, 2010; LARBAT *et al.*, 2012; NAGHILOO *et al.*, 2012).

A concentração e o acúmulo de metabólitos secundários também são afetadas no nível genético. Os genes envolvidos na via biossintética são geralmente controlados por vários fatores de transcrição que desempenham um papel importante na regulação da concentração, acúmulo e biossíntese de diferentes metabólitos secundários. O aumento na produção de diferentes metabólitos secundários pode ser alcançado através da cultura *in vitro* de tecidos, utilizando-se reguladores de crescimento de plantas que claramente demonstram que sua concentração pode ser alterada. Geralmente, tem sido observado que os metabólitos secundários não permanecem estabilizados como outros caracteres qualitativos e quantitativos. Assim, os fatores que influenciam a flutuação nos metabólitos secundários de plantas podem ser divididos em quatro grupos principais: (I) fatores genéticos, (II) ontogênicos (III), morfogenéticos e (IV) ambientais. Todos esses quatro fatores principais são importantes na produção ou no acúmulo dessas moléculas (VERMA; SHUKLA, 2015) (Figura 2).

Figura 2 - Vários fatores que afetam a síntese de metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Adaptado de Verma e Shukla (2015).

Os metabólitos secundários possuem atividades biológicas importantes, muitos são de grande valor comercial. Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse está no número elevado de substâncias farmacologicamente importantes (SOBRINHO *et al.*, 2011). Na verdade, esses compostos têm sido utilizados há séculos no tratamento de doenças humanas. Relatórios do uso de plantas medicinais remontam aos tempos antigos. Os registros escritos datam de pelo menos 5000 anos para os sumérios (SWERDLOW, 2000) e os registros arqueológicos sugerem o uso ainda mais antigo de plantas medicinais (PIERPOINT, 1994). No nordeste brasileiro, no Estado do Ceará especificamente, cerca de 46% das plantas são conhecidas e utilizadas na medicina tradicional, devido a sua abundância de metabólitos secundários (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

3.2 PAU BRANCO (*Cordia oncocalyx* Allemão)

A Caatinga ocupa mais de 10% do território nacional, sendo considerado o bioma do semiárido mais rico do mundo em biodiversidade (BRASIL, 2018) e o único bioma exclusivamente brasileiro. A relação entre os fatores abióticos como solo-clima-pluviosidade pode explicar, em parte, a grande diversidade de fisionomias aliada à composição florística, com muitas das espécies vegetais endêmicas no bioma. Estima-se que pelo menos 932

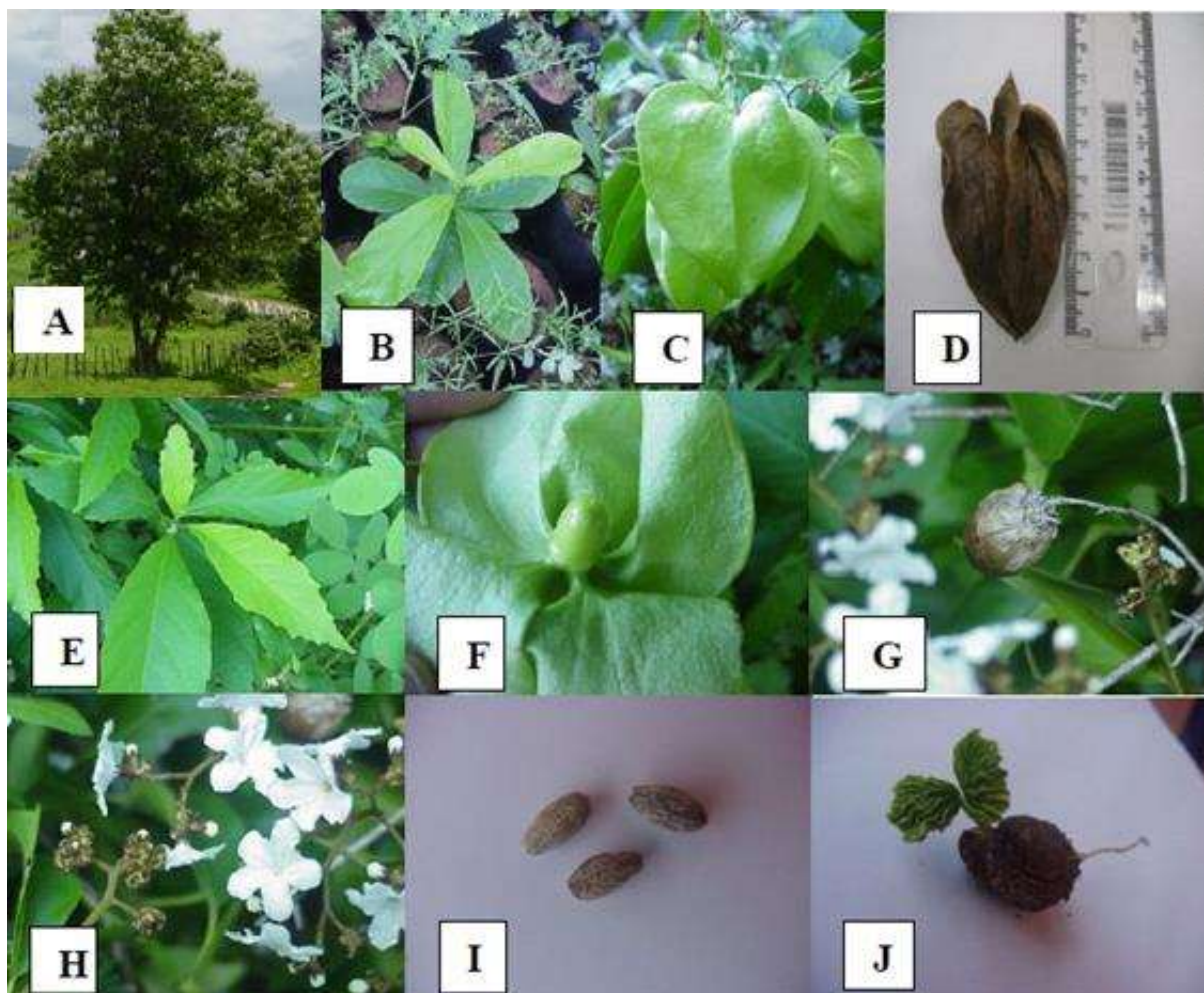
espécies foram registradas na região, sendo 380 delas endêmicas (GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013).

Entre essas espécies endêmicas, destaca-se *Cordia oncocalyx* Allemão (GOTTSCHLING; MILLER, 2006), pertencente à família Boraginaceae, denominada anteriormente como *Auxemma oncocalyx* (Allemão) Baill (GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013). O gênero *Cordia* apresenta uma ocorrência e distribuição em áreas com clima tropical e subtropical nas Américas Central e do Sul, Índia, Ásia e África. As espécies do gênero *Cordia* são especialmente incluídas em estudos de produtos naturais de origem vegetal devido à sua diversidade de propriedades químicas, biológicas e farmacológicas (MATIAS *et al.*, 2010a, MATIAS *et al.*, 2010b).

Cordia oncocalyx apresenta os seguintes nomes populares no Estado do Ceará: louro-branco, pau branco, pau branco-preto e pau branco-do-sertão; no Rio Grande do Norte: freijorge, freijó, pau branco e pau branco preto (CARVALHO, 2008). O médico e botânico brasileiro Francisco Freire Allemão (1797-1874) foi o descobridor do potencial de madeiras de espécies da Caatinga, entre elas o pau branco (MORAIS, 2005) e a descreve como árvore de pequeno porte, produtora de madeira pesada e de boa qualidade, resistente ao ataque de fungos e cupins, bastante empregada na construção civil, marcenaria e carpintaria. Como consequência da beleza de suas flores, brancas e em densas panículas terminais, são empregadas no paisagismo, na ornamentação de praças e avenidas (LEMOS *et al.*, 2005).

Cordia oncocalyx é uma espécie arbórea com copa frondosa e caráter decíduo, atingindo em estágio adulto uma altura de aproximadamente 12 m e 45 cm de diâmetro (Figura 3A) (CARVALHO, 2006; GOTTSCHLING; MILLER, 2006). O tronco apresenta-se ramificado com multitroncos em uma altura do solo de 20 a 30 cm, é dicotômica e muito ramificada, sua casca externa encontra-se esbranquiçada com diâmetro de 1 mm a 3 mm, salientes e dispostas irregularmente e nelas podem ser destacadas facilmente do tronco, sua casca interna apresenta uma coloração bege-clara, exudado aquoso, sem sabor e odor distinto. As folhas são elípticas, íntegras e serradas do meio para o ápice, oblongas ou oblongo-ovadas, apresenta glândulas salientes em sua face adaxial e esparsas, com pêlos simples ao longo das nervuras na sua face abaxial apresentando raros tricomas (Figuras 3B e 3D). Seu pecíolo é cilíndrico, mais ou menos desenvolvido, chegando a atingir até 4 cm de comprimento (CARVALHO, 2008).

Figura 3 - Aspectos da planta de *Cordia oncocalyx* Allemão.



A = Exemplar adulto, B = muda com seis meses de idade, C = fruto verde, D = fruto maduro, E = folhas com bordas serreadas, F = fruto após uma semana de fecundação, G = fruto maduro após a perda das brácteas, H = flores e botões florais, I = fruto com endocarpo, J = plântula com folhas cotiledonares. Fonte: Adaptado de Guimarães; Coelho e Azevedo (2013).

A inflorescência é do tipo tirso constituída de densas panículas, suas flores são alvas e perfumadas (Figura 3H). O período de floração se inicia há cerca de um mês após o início das chuvas e se estende por até 120 dias (SILVA; MACHADO, 1997). O cálice é campanulado, medindo 0,2 cm a 0,3 cm, piloso na face externa e glabro na face interna, com cinco dentes. A corola é campanulado infundibuliforme, medindo cerca de 0,75 cm a 1 cm, actinomorfa, pilosa na face externa e glabra na interna. O fruto é do tipo drupa elipsoide, periforme, medindo de 1,5 cm a 2 cm de comprimento e 1,7 cm de largura, envolta por uma vesícula penta-angulosa, formada pelo cálice acrescente e em forma de balão inflado (Figuras 3C, 3D e 3G), cônico, medindo de 5 cm a 8 cm de comprimento, com 1 a 4 sementes o que facilita a dispersão pelo vento, ou seja, anemocoria (SILVA; MACHADO, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2005; CARVALHO, 2008). A formação e amadurecimento dos frutos ocorrem entre abril e

setembro, com a subsequente dispersão por anemocoria (SILVA; MACHADO, 1997). As sementes apresentam forma elíptico acuminada, ásperas e normais (Figura 3I) (CARVALHO, 2008).

Cordia oncocalyx é amplamente empregada no nordeste brasileiro para diversas finalidades. Estudos farmacológicos anteriores mostraram que o extrato hidroalcoólico do caule possui atividade antiplaquetária (FONTENELE; SOUSA, 1992) e esse efeito foi confirmado em uma fração hidrossolúvel, obtida a partir do extrato metanólico do cerne, que também apresentou atividade antioxidante (FERREIRA *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2001).

Ademais, uma fração solúvel em água de um extrato etanólico obtido do cerne de *C. oncocalyx* mostraram inibir a agregação plaquetária humana induzida por vários agonistas como, colágeno, trombina, ácido araquidônico e adrenalina em plasma rico em plaquetas, de maneira reversível e dependente de concentração (FERREIRA *et al.*, 1999). Além disso, este extrato apresentou propriedades antioxidantes, analgésicas e antiinflamatórias *in vivo* (FERREIRA *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004). Outros efeitos também foram atribuídos ao extrato hidroalcoólico, como atividades antitumoral (PESSOA *et al.*, 1992), analgésica e antiinflamatória (LINO *et al.*, 1996).

Das cascas retira-se quantidade significativa de alantoína (PESSOA; LEMOS, 1997), substância com propriedades cicatrizante, anti-inflamatória e regeneradora de tecidos necrosados cientificamente comprovadas. Desta forma, acredita-se que a alantoína seja o princípio ativo das cascas deste vegetal (GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013). Muitos outros metabólitos secundários também foram isolados do extrato hidroalcoólico, incluindo o β -sitosterol, seu glicósido (3 β -O-Dglucopiranosil sitosterol), quinonas monoterpenoides e hidroquinonas (PESSOA *et al.*, 1993; PESSOA *et al.*, 1995; MARQUES *et al.*, 2000).

O principal composto isolado de *C. oncocalyx* foi oncocalexona A (onco A), uma quinona meroterpenoide, que foi obtida em quantidades significativas. Em geral, os compostos ativos são isolados em pequenas quantidades, no entanto, onco A é o principal composto produzido por *C. oncocalyx* (0,13% do extrato bruto). Isto, quando combinado com suas propriedades ativas, torna o onco A, um composto adequado para o desenvolvimento de fármacos (BARRETO *et al.*, 2013).

3.3 ONCOCALIXONA A: UMA QUINONA COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As quinonas são metabólitos secundários isolados principalmente de plantas, que possuem um sistema aromático (saturado hexacíclico) di-ona ou di-cetona (EYONG; KUET; EFFERTH, 2013; CASTRO *et al.*, 2005). 1,4-Benzoquinona ou *p*-benzoquinona (Figura 4) é a estrutura básica dos compostos quinonoides (ABRAHAM *et al.*, 2011). Essa estrutura química característica das quinonas é de grande importância em alguns processos biológicos, uma vez que é responsável pelas propriedades terapêuticas (BAYEN *et al.*, 2007). Esses metabólitos são geralmente derivados da oxidação de compostos fenólicos e incluem benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e poliquinonas (FERREIRA *et al.*, 2003; EYONG; KUET; EFFERTH, 2013).

Figura 4 - Estrutura química do 1,4-benzoquinona e *p*-benzoquinina.

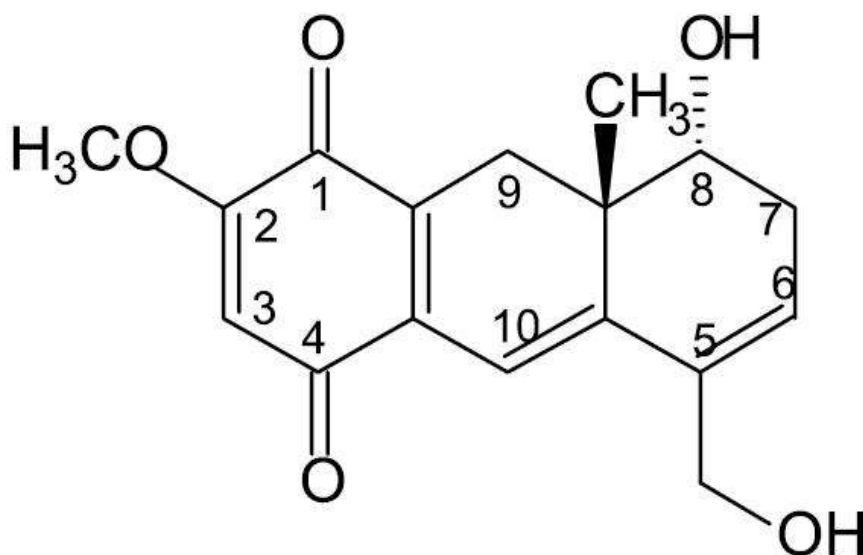


Fonte: Adaptado de Eyong; Kuet e Efferth (2013).

3.3.1 Propriedades Físico-químicas

A oncocalixona A (onco A) (rel-8 α -hidróxi-5-hidróximetil-2-metóxi-8 α,β -metil-7,8,8a,9-tetrahidro-1,4 antracenediona) (Figura 5) é uma *p*-benzoquinona (COSTA *et al.*, 2012) que apresenta-se como um pó vermelho escuro solúvel em solventes orgânicos como acetona e clorofórmio (FERREIRA *et al.*, 2004; CUNHA, 2005; ILLAJARA *et al.*, 2014), etanol (COSTA *et al.*, 2002; ABRAHAM *et al.*, 2011; ILLAJARA *et al.*, 2014), metanol (FERREIRA *et al.*, 2003; ILLAJARA *et al.*, 2014). O conhecimento da solubilidade das moléculas candidatas a fármacos é crucial para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, uma vez que afeta o desenvolvimento da formulação, além de influenciar parâmetros farmacocinéticos e consequentemente na eficácia do próprio composto (SHARAPOVA *et al.*, 2017).

Figura 5 - Estrutura química da oncocalixona A.



Fonte: Costa *et al.* (2012).

Os estudos físico químicos da onco A se concentraram em um amplo espectro de tópicos relacionados à ocorrência na natureza (MARQUES *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2004; PESSOA *et al.*, 2006), síntese (CASTRO *et al.*, 2005; ABRAHAM *et al.*, 2011), desenvolvimento de sensor para determinação analítica (COSTA *et al.*, 2008), uso de métodos eletroquímicos para estudos de interação com DNA, Nucleobases e N-Acetilcisteína (COSTA *et al.*, 2012), química computacional (JOSH *et al.*, 2013; XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2019), estudos de calorimetria de titulação isotérmica, complexação com ciclodextrinas e modelagem molecular (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2019).

A abundância de artigos que descrevem os aspectos multifuncionais acima mencionados demonstra interesse contemporâneo na química dessa quinona. Contudo, não há estudos na literatura, acerca de algum método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificá-la em formulações farmacêuticas, bem como literatura também não apresenta nenhum dado sobre determinações experimentais de solubilidade, coeficiente de partição (logP) para a referida molécula.

O coeficiente de partição é um dos mais relevantes representantes de lipofilicidade, aplicados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de um composto. Além disso, é possível estimar a biodisponibilidade do composto através da determinação de sua capacidade de atravessar membranas celulares, que é avaliada pela lipofilia do composto como um coeficiente de partição em sistemas octanol/água (KERNES; DI, 2008; SHARAPOVA *et al.*, 2017).

Sendo assim, a determinação experimental da solubilidade, coeficiente de partição, bem como um método de quantificação de moléculas candidatas a fármacos são fundamentais para estudos de formulações posteriores, de sistemas farmacêuticos tanto convencionais quanto de liberação controlada, para veiculação de fármacos (KERNS; DI, 2008; XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2016).

3.3.2 Propriedades Biológicas da Onco A

Várias atividades biológicas já foram comprovadas para a onco A, a Tabela 1 mostra as atividades já descritas pela literatura:

Tabela 1 - Atividades biológicas da onco A.

Atividades Farmacológicas	Referências
Anti-agregante plaquetário	(FERREIRA <i>et al.</i> , 1999; FERREIRA <i>et al.</i> , 2008)
Antibacteriana	(LLAYAJARA <i>et al.</i> , 2014)
Antiglicante (<i>in vitro</i>)	(VIEIRA DE MELO <i>et al.</i> , 2015)
Antimitótica (<i>in vivo</i>)	(COSTA-LOTUFO <i>et al.</i> , 2002)
Antioxidante (<i>in vivo</i>)	(FERREIRA <i>et al.</i> , 2003)
Antitumoral	(BARRETO <i>et al.</i> , 2013)
Analgésica e anti-inflamatória (<i>in vivo</i>)	(FERREIRA <i>et al.</i> , 2004; LLAYAJARA <i>et al.</i> , 2014)
Citotóxica frente a linhagens cancerosas	(PESSOA <i>et al.</i> , 2000; LEVYA <i>et al.</i> , 2000; PESSOA <i>et al.</i> , 2004)
Genotoxicidade (<i>in vitro</i>)	(PESSOA <i>et al.</i> , 2003)
Hipoglicemiante	(SIVAGNANAN; KALAIVANANAN; RAJAMANICKAM, 2013)
Inibidora de contração neurogênica	(MATOS <i>et al.</i> , 2017)
Leishmanicida	(VIANA <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: autor próprio.

Além das atividades descritas na Tabela 1, Matos *et al.* (2017), colocam a onco A como um possível agente útil para várias indicações terapêuticas, como dores neuropáticas, espasmos intestinais neurogênicos com dores abdominais agudas, diarreia com aumento do peristaltismo e ejaculação precoce (MATOS *et al.*, 2017). Alguns mecanismos de ação já descritos para a onco A envolvem a ativação de macrófagos microbicidas reponsável por sua ação Leissmanicida (VIANA *et al.*, 2015), interferência na ativação plaquetária induzida por colágeno associada a um aumento dos níveis de GMPc, não dependente do NO e com o bloqueio da glicoproteína GP Iba (FERREIRA *et al.*, 2008), inibição da síntese de DNA na fase S do ciclo celular, além de interferir com na polimerização de tubulina e formação de fuso mitótico (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudo sugere que à semelhança das antraquinonas anticancerígenas, a onco A é capaz de se intercalar com o DNA através de ligação de hidrogênio (PESSOA *et al.*, 2004).

A ação anti-inflamatória e analgésica foi reportado por Ferreira *et al.* (2004), no qual a administração de onco A por via intraperitoneal, nas doses de 10 e 30 mg/Kg inibiu, respectivamente 57 e 60% de reações inflamatórias experimentais. Por outro lado a administração oral do referido composto, inibiu cerca de 25 a 29% com doses de 100 a 200 mg/Kg de peso corporal, respectivamente, sugerindo baixa atividade anti-inflamatória quando administrada por via oral (FERREIRA *et al.*, 2004).

Essa diminuição na atividade farmacológica observada por Ferreira *et al.* (2004), pode resultar da inativação da molécula por ação do ácido clorídrico estomacal, de uma absorção ineficiente no trato gastrointestinal ou ainda de uma excessiva metabolização de primeira passagem, uma vez que ambos os fatores podem justificar o comprometimento da disponibilidade oral da onco A. Considerando a indispensabilidade de encontrar novas moléculas com atividade anti-inflamatória, os resultados de Ferreira *et al.* (2004) sugerem a necessidade de melhorar a biodisponibilidade oral da onco A no intuito de aperfeiçoar sua atividade anti-inflamatória, administrando-a por uma via de administração não invasiva e consequentemente de maior comodidade para os pacientes.

Nesse contexto, a complexação com ciclodextrinas bem como a aplicação da nanotecnologia farmacêutica, através do uso de um sistema de liberação controlada de fármacos para administração por via oral, especificamente um sistema mucoadesivo, seria uma alternativa para contornar tais limitações, uma vez que a camada mucoadesiva gera uma forte interação com a mucosa intestinal evitando a descarga do fármaco no lúmen, resultando em liberação unidirecional na superfície da mucosa, impedindo o acesso de enzimas líticas, impedindo a degradação dos fármacos veiculados e favorecendo a permeação através das

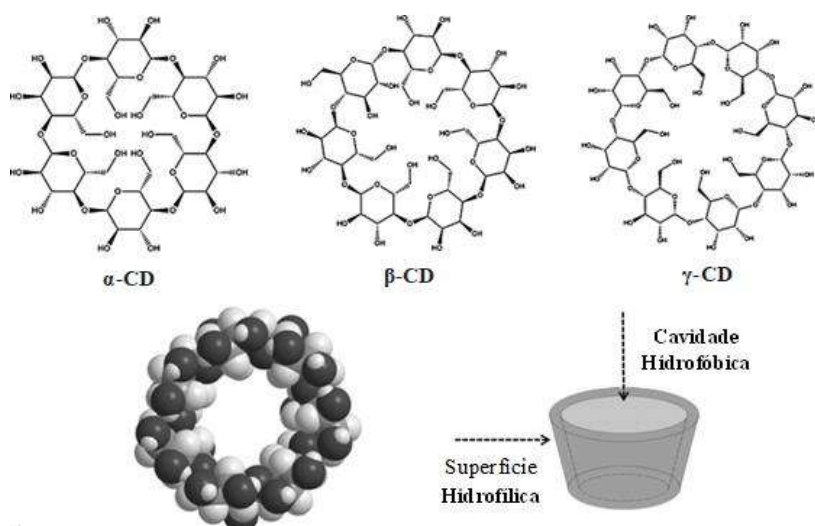
membranas intestinais (BANERJEE; LEE; MITRAGOTRI, 2016; KIRSCH; HANKE; WEITSCHIES, 2017).

3.4 CICLODEXTRINAS

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$. São obtidas a partir da degradação do amido por ação das enzimas denominadas como CD glicosiltransferases (CGTases) (BRITTO; NASCIMENTO; SANTOS, 2004; VENTURINI *et al.*, 2008). Do ponto de vista estrutural, as CDs apresentam-se na forma de “cones truncados” com a borda mais larga formada pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6. A dimensão da cavidade é determinada pelo número de unidades de glicose constituintes da CD (BRITTO; NASCIMENTO; SANTOS, 2004; PINHO *et al.*, 2014).

As mais importantes CDs apresentam ocorrência natural e que apresentam maior rendimento são as α (alfa), β (beta) e γ (gama) CDs que possuem seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente (SÁ-BARRETO; CUNHA-FILHO, 2008; VENTURINI *et al.*, 2008). Estas moléculas possuem cavidade de 7,9 Å de profundidade. Os diâmetros superior e inferior da cavidade das CDs são 4,7 e 5,3 Å para a α -CD, 6,0 e 6,5 Å para a β -CD e 7,5 e 8,3 Å para a γ -CD (VENTURINI *et al.*, 2008).

Figura 6 - Representação de α -CD, β -CD e γ -CD (da esquerda para a direita) e do aspecto truncado das CDs.



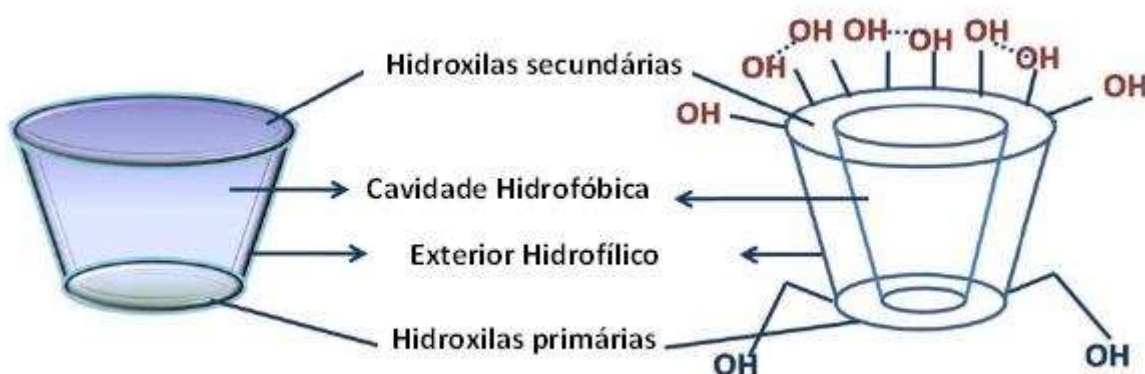
Fonte: Adaptado de Pinho *et al.* (2014).

Essas moléculas apresentam uma cavidade hidrofóbica e um exterior hidrofílico, características que confere a essas CDs a capacidade de formar complexos de inclusão com aminoácidos, vitaminas, fármacos, etc (DINAR *et al.*, 2014; PINHO *et al.*, 2014). Ademais, as ciclodextrinas têm sido utilizadas em aplicações como a catálise (NOËL *et al.*, 2014), separações (MALTA *et al.*, 2008) e remoção de contaminantes orgânicos de efluentes (CASSEZ *et al.*, 2006).

Atualmente, existem centenas de derivados das CDs. Entre eles, os derivados hidroxialquilados, por exemplo, os derivados hidroxipropil da β -CD e γ -CD (HP- β -CD e HP- γ -CD), que derivam da substituição dos grupos hidroxílicos em C2, C3 e C6 por substituintes 2-hidroxipropil; os metilados da β -CD, como, por exemplo, 2,3,6-metil- β -CD, derivado metilado aleatório na posição C2, C3 ou C6, cuja designação é *randomly methylate β -cyclodextrin* (RM β CD) e as sulfobutil-éter- β -CD (SBE- β -CD), poli-aniônica, cuja substituição em R= $-(CH_2)_4SO_3^- Na^+$ poderá complexar moléculas neutras, não somente pela inclusão na cavidade das CDs, mas também, por interação com as cadeias alquílicas dos substituintes (OKIMOTO *et al.*, 1996; THOMPSON, 1997; ZIA; RAJEWSKI; STELLA, 2001; MOSHER; THOMPSON; 2002).

Os derivados de CDs foram sintetizados por aminações, esterificações ou eterificações de grupos hidroxila primários e secundários nas CDs (Figura 7). Os grupos hidroxila podem ser derivados para modificar a especificidade e as propriedades físicas e químicas da CD. Em particular, os grupos 6-OH são os mais facilmente derivatizados para fazer CDs com melhor solubilidade, estabilidade à luz ou ao oxigênio, ou controlar a atividade química de moléculas hospedeiras (SILKDER *et al.*, 2019).

Figura 7 - Representação de uma CD e suas hidroxilas primárias e secundárias.



Fonte: Adaptado de Silkder *et al.* (2019).

Desta forma, os CDs podem ser modificados para produzir derivados com estruturas químicas e propriedades alteradas. A solubilidade de derivados de CD varia de acordo com o substituinte e a posse de uma cavidade hidrofóbica alterada (SZETJLI, 1998). A diversidade de derivados de CD também facilita a formação de complexos supramoleculares, permitindo, inclusive, a ligação covalente ou não covalente entre si, através de reações de reticulação bem estabelecidas (SILKDER *et al.*, 2019). As características de alguns CDs modificados selecionados são fornecidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características e aplicações das CDs e derivados.

Derivado Ciclodextrina	Características	Principais Aplicações	Referências
α -CD	Solubilidade 145 mg/mL	Farmácia/Cosméticos	(CHIOU; LI, 2003)
β -CD	Solubilidade 185 mg/mL	Farmácia/Medicina	(CHIOU; LI, 2003)
γ -CD	Solubilidade 232 mg/mL	Farmácia/Cosméticos	(CHIOU; LI, 2003)
HP- β -CD	Solubilidade ≥ 600 mg/mL	Aplicações ambientais	(FENYVESI <i>et al.</i> , 2005)
CDs Metiladas (Metil- β -CD)	Hidrofílicas	Solubilizante para compostos orgânicos	(FENYVESI <i>et al.</i> , 2005)
CDs Hidroxiladas (2-Hidroxi- propil- β -CD)	Hidrofílicas	Solubilizante e carreador de fármacos hidrofóbicos/Potencial interação com metais iônicos	(UEKAMA; FUMITOSHI; TETSUMI, 1998; UEKAMA, 2012)
CDs Ramificadas (Glicosil- β -CD; Maltosil- β -CD; Dimaltosil- β -CD)	Hidrofílicas	Ideais para remoção de colesterol de eritrócitos humanos	(YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1989; HIRAYAMA YAMAMOTO; UEKAMA, 1992)
CDs aciladas	Hidrofóbicas/ Alta estabilidade	Facilmente degradável por ácidos e bases; Interagem com	(CESTEROS; GONZALEZ-TERESA; KATIME, 2009)

		poluentes orgânicos	
CDs aniônicas	Ionizáveis/ Derivados com cargas negativas	Eficaz separador quiral/coordena com íons metálicos, especialmente cátions lantanídeos	(IRENE; KONSTANTINA, 2015)
CDs catiônicas	Ionizáveis/Alta mobilidade eletroferética/ Alta solubilidade	Eficaz separador quirar; Separação enantiomérica de herbicidas de ácido fenoxipropiónico	(JUDSON <i>et al.</i> , 1998)
Sulfobutileter- β -CD	Solubilidade ≥ 500 mg/mL	Agente solubilizante seguro; agente estabilizante e seletor quiral	(LUNA <i>et al.</i> , 1996)
β -CD-metilada aleatoriamente	Solubilidade ≥ 500 mg/mL	Uso efetivo em produtos farmacêuticos, cosméticos e tecnologias de remediação do solo	(YANLI <i>et al.</i> , 2010)
Hidroxipropil- γ - CD	Solubilidade ≥ 500 mg/mL	Agente solubilizante e aprimora a dissolução de algumas moléculas	(VEIGA; AHSAN, 1999)
Epicloridrina- β - CD	Solubilidade ≥ 500 mg/mL	Potencial para interagir com poluentes ambientais	(GIDWANI; VYAS, 2014)
Carboximetil Epicloridrina- β - CD	Solubilidade ≥ 250 mg/mL	Altamente funcional para fins ambientais; facilmente biodegradável	(FOLCH-CANO; YAZDANI-PEDRA; OLEA-AZAR, 2014)

Fonte: Adaptado de Skilder *et al.* (2019).

3.4.1 Ciclodextrinas na Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica, as CDs são amplamente utilizadas como carreadores de fármacos, incrementando a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de moléculas bio-ativas (DINAR *et al.*, 2014; PINHO *et al.*, 2014). Ademais, as CDs são utilizados na indústria farmacêutica com propósitos de aumentar a dissolução e a biodisponibilidade a estabilidade físico-química e melhorar a vida útil dos fármacos, além de modificar o perfil e o tempo de liberação dos fármacos e minimizar as reações adversas a medicamentos, como irritação gastrointestinal e ocular; reduzir ou eliminar o gosto e o cheiro desagradáveis; prevenir interações fármaco-fármaco ou fármaco-excipiente, além de converter fármacos líquidos em pós microcristalinos ou amorfos (SALÚSTIO *et al.*, 2011; ADEOYE; CABRAL-MARQUES, 2017; CONCEIÇÃO *et al.*, 2018).

Além disso, a complexação da CD também pode ser explorada para mascarar reduzir a evaporação e estabilizar substâncias voláteis, proteger moléculas sensíveis à luz ou ao oxigênio, converter substâncias líquidas e óleos em pó de fluxo livre (MURA, 2014). Estudos mostraram que as CDs são capazes de aumentar a permeabilidade do fármaco através de barreiras biológicas, sem causar alterações permanentes nas membranas, modificando assim, suas propriedades físico-químicas e comportamento *in vivo* (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; LOFTSSON; MASSON, 2001; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

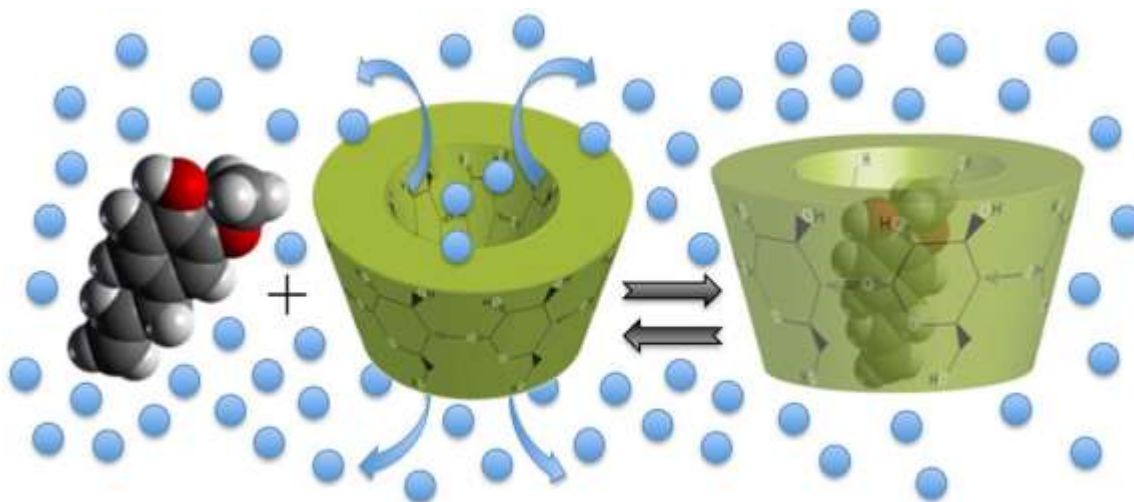
O uso farmacêutico das ciclodextrinas naturais (α -CD, β -CD e γ -CD) vem sendo gradativamente substituído, ao longo dos anos, pelos seus derivados semi-sintéticos que oferecem maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido as alterações das suas propriedades físico-químicas originais (GUEDES *et al.*, 2008). Nesse sentido, CDs naturais e modificados têm sido usados para superar as desvantagens dos fármacos e melhorar sua baixa solubilidade em água (PASSOS *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2013). Além disso, os CDs também demonstraram sua capacidade de incluir moléculas hospedeiras solúveis em água (SOUSA *et al.*, 2008).

A complexação sofre grande influência da geometria da molécula hóspede, das propriedades físico-químicas da CD tais como o tamanho da cavidade e hidrofiliabilidade do exterior. Além disso, os métodos e variáveis envolvidas na reação de complexação (liofilização, temperatura e pH) também são relevantes nesse processo (LOFTSSON; BREWSTER, 2001; LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

Embora o papel tradicional das ciclodextrinas (CDs) na indústria farmacêutica tenha sido o de melhorar a solubilidade aquosa, a estabilidade físico-química e fisiológica e a

capacidade de entrega substâncias ativas através da formação de complexos de inclusão com várias moléculas farmacologicamente ativas (Figura 8) (LOFTSSON; BREWSTER, 1996; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007), outras formas de complexos, como os complexos de não inclusão ou associação, também foram descritos na literatura com a mesma finalidade (LOFTSSON; MASSON; BREWSTER, 2004).

Figura 8 - Esquema de uma formação típica de um Complexo de Inclusão.



Fonte: Mura (2014).

As forças intermoleculares envolvidas na complexação de inclusão são interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo, interação eletrostática, Van der Waals, forças de dispersão de London e ligações de H (LIU; GUO, 2002; MURA, 2014; RADU; PARTENI; OCHIUZ, 2016). Nenhuma ligação covalente é formada durante todo o processo de complexação (MURA, 2014; MAGNUSDOTTIR; MASSON; LOFTSSON, 2002). A principal força motriz é considerada a substituição das interações polar-apolares, desfavorecidas, entre as moléculas de água inclusas e a cavidade da CD, pelas interações apolares-apolares, mais favoráveis, entre o hóspede e a cavidade do hospedeiro (MURA, 2014).

O exterior dos CDs compreende grupos terminais OH- que criam um ambiente ácido que pode ligar covalentemente funções hidrofílicas permitindo interações físicas, ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, Van der Waals, eletrostáticas, de troca iônica, quelatação, além de reações ácido-base ou precipitação, caracterizando os complexos de não inclusão ou associação com outras moléculas (MORIN-CRINI *et al.*, 2018).

Nesse contexto, dois tipos de complexos podem ser distinguidos: se a inclusão está completa e há contribuição majoritária para o complexo, fala-se de um complexo de inclusão. Se a inclusão é apenas parcial, sugere-se um complexo de associação. Essa distinção foi

introduzida por Cramer (ATWOOD; DAVIES; MACNICOL, 1994; CRINI, 2014) na década de 50 e confirmada por Szejtli (SZEJTLI; AKADÉMIAI, 1982; CRINI, 2014) nos anos 80.

3.4.2 Estudos de Caracterização de Complexos de Inclusão

A compreensão dos métodos analíticos de caracterização dos complexos fármaco:ciclodextrinas é de fundamental importância para melhorar as aplicações dos complexos de inclusão. Para tal, é importante dispor de técnicas analíticas adequadas para sua caracterização. Em particular, a determinação das constantes de estabilidade dos complexos de inclusão é um ponto crucial para a avaliação da complexação (MURA, 2014).

Várias técnicas que têm sido utilizados para estudar os complexos de inclusão em fases sólidas e líquidas incluem: microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC) também são amplamente utilizados (MURA, 2014; NARAYANAN *et al.*, 2017), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise de difração raios X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , ROESY, NOESY em solução), métodos térmicos (calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA), difractometria de Raios X de ângulo amplo (WAXD) e espectroscopia ultravioleta / visível (UV-VIS), etc. Outras técnicas, tais como, microscopia eletrônica, polarografia, condutividade, espectroscopia de dicroísmo circular e titulação potenciométrica (MURA, 2014; NARAYANAN *et al.*, 2017).

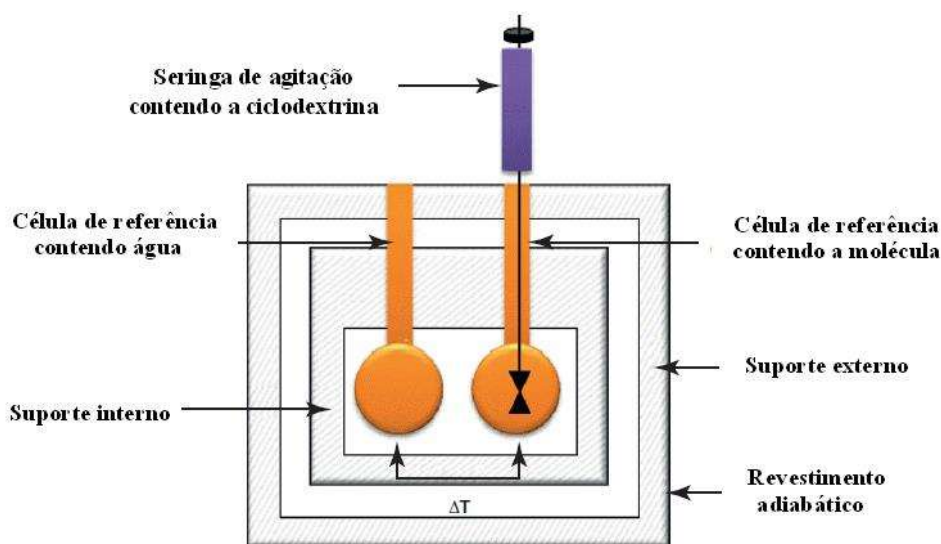
3.4.2.1 Microcalorimetria de Titulação Isotérmica

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) é uma técnica que baseia-se na medição do calor gerado ou absorvido na interação entre duas moléculas (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012). É um método útil para determinar as propriedades termodinâmicas, constantes de associação e estequiometria de moléculas interagentes em soluções aquosas, com base na medição de mudanças em seus parâmetros termodinâmicos (FALCONER; COLLINS, 2011). O ITC é atualmente considerado um dos métodos mais importantes para a caracterização dos mecanismos de interação de CDs com fármacos (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012; NARAYANAN *et al.*, 2017).

Os experimentos de ITC consistem em injeções consecutivas de pequenos volumes (5-10 μL) de uma solução aquosa de CD (contida na seringa de agitação) em uma solução de molécula hóspede que está contida na célula de medição (Figura 9). Uma potência constante é

aplicada à célula de referência, ativando um circuito de *feedback*, que aplica uma potência variável à célula da amostra, na qual o ligante é titulado. Isso mantém uma diferença de temperatura muito pequena e monitorada entre as células. As reações exotérmicas geram calor, desencadeando uma diminuição no poder de feedback, enquanto as reações endotérmicas aumentam o poder de feedback (HOLDGATE; WARD, 2005; BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012). A célula de medição é mantida a uma temperatura constante e o calor do processo que ocorre durante a injeção é monitorado para cada injeção e plotado em função do tempo (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012).

Figura 9 - Aparato da Colorimetria de Titulação Isotérmica.



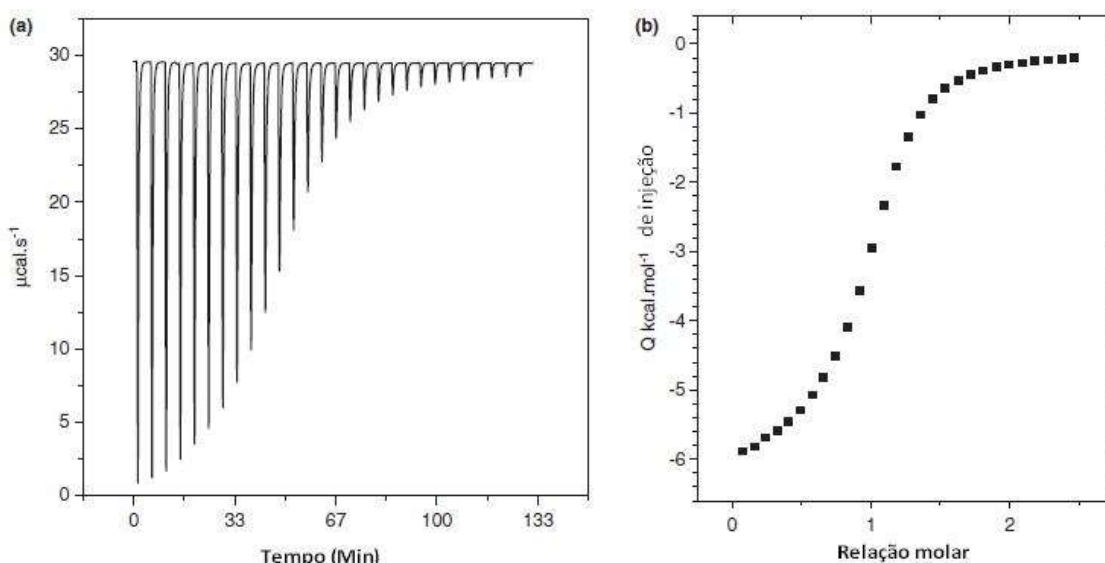
Fonte: Adaptado de Bouchemal e Mazzaferro (2012).

O ITC mede diretamente a mudança de entalpia após a ligação. O instrumento de ITC opera com um sistema de retroalimentação diferencial de células, onde a célula de referência é preenchida com o tampão e a célula de amostra geralmente contém a macromolécula, na qual o ligante é titulado. A injeção do ligante produz calor que surge de quatro fontes: a interação de ligação, a diluição do ligante, a diluição da macromolécula e calor devido à mistura (HOLDGATE; WARD, 2005).

As mudanças de calor que surgem na célula da amostra causam uma diferença de temperatura (ΔT) entre as duas células, que é detectada pelo calorímetro e desencadeia uma mudança no poder de retroalimentação (feedback) aplicado à célula da amostra (HOLDGATE; WARD, 2005; BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012; NARAYANAN *et al.*, 2017).

Quando a CD é adicionada à solução contendo a molécula convidada, as duas moléculas interagem e o calor resultante é proporcional à quantidade de CD adicionado para a solução da molécula hóspede. Como a população da molécula hóspede na célula fica mais saturada com CDs, o sinal de calor diminui progressivamente (Figura 10a). A curva de integração (Figura 10b) pode então ser ajustada a vários modelos, tornando possível determinar as constantes de associação, a estequiometria e os perfis termodinâmicos da interação (PEROZZO; FOLKERS; SACPOZZA, 2004; HOLDGATE; WARD, 2005; LIU *et al.*, 2008; BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012).

Figura 10 - Dados de calorimetria de titulação isotérmica obtidos para a interação molécula-CD em água a 25 °C.



Molécula hóspede (23 mM) para CD (15 mM). a) Mostra liberação de calor exotérmico por injeção de alíquotas de 10 mL de CD na solução da molécula hóspede; b) Mostra dados de calor integrados, dando uma curva de ligação diferencial. Fonte: Adaptado de Bouchemal e Mazzaferro (2012).

ITC é o método mais sensível disponível para a determinação da estequiometria da interação (N), a constante de afinidade (K) (também chamada de estabilidade ou constante de associação) e a variação de entalpia (ΔH), que reflete o calor liberado ou absorvido durante a interação. Além disso, a entropia (ΔS) e a energia livre de Gibbs do processo (ΔG) podem ser calculadas a partir dos dados do ITC (BOUCHEMAL *et al.*, 2009; SEGURA-SANCHEZ *et al.*, 2009; SAJEESH *et al.*, 2010; MAZZAFERRO *et al.*, 2011; NARAYANAN *et al.*, 2017).

Em uma análise termodinâmica, o principal objetivo é determinar ΔG , ΔH e ΔS e sua dependência de temperatura por ΔC_p , uma vez que esses quatro parâmetros fornecem uma descrição das energéticas que governam as interações moleculares (PEROZZO; FOLKERS,

SCAPOZZA, 2004). No entanto, um modelo adequado deve ser aplicado para ajustar a curva de titulação e os resultados extraídos dos experimentos ITC devem ser interpretados com cuidado (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012).

As grandezas termodinâmicas obtidas pela complexação de inclusão por CDs são uma consequência das contribuições das interações intermoleculares de ligantes com a molécula hóspede. A variação de entalpia (ΔH) obtida da análise ITC representa um calor global resultante da interação do hóspede com a CD (COOPER, 1999; COOPER *et al.*, 2001).

Quando uma solução da seringa de agitação é titulada com uma solução da célula de referência, o calor da titulação é usualmente interpretado como a soma de várias contribuições: o calor de reação entre titulante e titulado, o aquecimento de diluição dos reagentes e um calor mecânico associado a injeção. A entalpia de interação entre as moléculas é calculada a partir desse calor total. O calor mecânico pode ser estimado pela titulação do solvente consigo mesmo (GROLIER *et al.*, 2012).

O ITC permite que os valores da variação de entalpia (ΔH), K_a (Constante de associação) e estequiometria (n) e capacidade calorífica (ΔC_p), associados à complexação de inclusão e sejam medidos em um único experimento, usando as Equações 1 e 2 (PEROZZO; FOLKERS; SCAPOZZA, 2004; HOLDGATE; WARD, 2005; NARAYANAN *et al.*, 2017):

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

Onde:

ΔG = energia livre de Gibbs

R = Constante Universal dos Gases ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = Temperatura Absoluta (Kelvin)

K_a = Constante de Associação

ΔH = Variação de Entalpia

ΔS = Variação de Entropia

Como estes experimentos são tipicamente realizadas a uma temperatura constante, observações experimentais precisam ser conduzidas em várias temperaturas para obter a mudança de capacidade de calor (ΔC_p) da reação (PEROZZO; FOLKERS; SCAPOZZA, 2004; ARROYO-MAYA; MCCLEMENTS, 2016; NARAYANAN *et al.*, 2017):

A energia livre de Gibbs é dependente da temperatura e é descrita por:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_0) - T\Delta S(T_0) + \Delta C_p (T - T_0 - T \ln(T/T_0)) \quad (3)$$

Onde ΔC_p é a mudança de capacidade de calor e T_0 é uma temperatura de referência apropriada. A Equação (3) mostra que as mudanças de entalpia e entropia dependem da temperatura através da mudança na capacidade de aquecimento ΔC_p :

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \Delta C_p (T - T_0) \quad (4)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_0) + \Delta C_p \ln(T/T_0) \quad (5)$$

Grandes alterações positivas no ΔS surgem geralmente das significativas liberdades translacionais e conformacionais do hospedeiro e do hóspede na complexação (COOPER, 1999; COOPER *et al.*, 2001). A entropia da interação também pode ser calculada de acordo com a Equação (6) para o K e o ΔH derivado do ajuste da curva de titulação do ITC:

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (6)$$

Os principais interações químicas envolvidas são ligações de Van der Waals e interações hidrofóbicas. O estudo de ΔH e ΔS leva a uma diferenciação entre os tipos de forças não-covalentes envolvidas nas interações molécula hóspede-CD. As interações de Van der Waals são processos conduzidos por entalpia com entropias de interação menos favoráveis ou desfavoráveis ($\Delta H > T\Delta S$) (COOPER *et al.*, 2001). As interações hidrofóbicas são dirigidas por entropia de interação, onde a entropia da interação é positiva, sendo maior que a entalpia ($\Delta H < T\Delta S$) (REKHARSKY; INOUE, 2006). Estudos relataram que a interação de CDs com moléculas hóspedes neutras ou carregadas positivamente revelou a presença de interações eletrostáticas, Van der Waals, ligações de hidrogênio e hidrofóbicas (REKHARSKY; INOUE, 2002; WENZ *et al.*, 2008).

3.4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

O FTIR geralmente fornece apenas informações qualitativas, no entanto, valiosas sobre o comportamento vibracional das ligações químicas presentes nos materiais. Quando as moléculas hóspedes estão presentes dentro das cavidades CD, além da presença de ambas as

moléculas de CD e hóspede, devido a impedimento estérico e variações na distribuição eletrônica com redistribuição de cargas, mudanças significativas nos comprimentos de onda das moléculas hóspedes podem ser observadas (UPADHYE *et al.*, 2010).

Essas mudanças nas frequências vibracionais dos hóspedes podem indicar a presença de complexos com as ciclodextrinas. Além dos deslocamentos, as intensidades de pico das moléculas hóspedes diminuem, à medida que a estequiometria entre as moléculas CD e hóspede aumenta, o que indica um rearranjo da distribuição de cargas da molécula hóspede. Isto pode se dar, por exemplo, devido ao fenômeno de transferência de carga da molécula hóspede para a molécula hospedeira (HIRLEKAR; KADAM, 2009).

As diferenças de intensidade dos pico podem, assim, também serem utilizadas para diferenciar qualitativamente diferentes Complexos não estequiométricos formados entre “convidados” apenas parcialmente inclusos e CDs hospedeiras (NARAYANAN; GUPTA; TONELLI, 2015). Contudo, o FTIR não é uma ferramenta completamente inequívoca para caracterizar os complexos não estequiométricos (NARAYANAN *et al.*, 2017).

3.4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

A elucidação das estruturas moleculares é mais frequentemente realizada usando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Assim como no FTIR, o RMN oferece a possibilidade de estudar, além da molécula hóspede, as CDs hospedeiros e seus CIs através de mudanças nas frequências de ressonância observadas em solução (NARAYANAN *et al.*, 2017). Complementares aos estudos de FTIR, cujas frequências de absorção podem ser afetadas por ambientes intermoleculares e pelas conformações intramoleculares, os picos de ressonância de RMN sofrem grande influencia das conformações moleculares. Além disso, o RMN pode ser usada para estudar as forças motrizes e os modos de ligação dos fenômenos de complexação em sólidos e líquidos (SCHNEIDER *et al.*, 1998).

Quando ocorre a complexação, mudanças nas frequências de ressonância dos núcleos dos átomos constituintes das moléculas de CDs e/ou moléculas hóspedes ocorrem, essas mudanças podem ser observadas em espectros da solução de RMN do próton (^1H) ou RMN do carbono ^{13}C (BENDER; KOMIYAMA, 1978). Em ^1H -NMR, observaram-se mudanças significativas no campo superior para os prótons intracavitários H-3 e H-5 e desvios de campo reduzidos para os prótons externos H-1, H-2 e H-4, característico da formação de Complexo de Inclusão (DUAN *et al.*, 2005). Dependendo do tipo de convidado usado, pode haver observância de desvios de picos para o hóspede (FUKUDA *et al.*, 2008). A solução ^1H -RMN

tem sido observada como uma excelente ferramenta para estimativa de estequiometria entre o hóspede e CD (MARTÍNEZ *et al.*, 2007; WILLIAMSON; TONELLI, 2011; NARAYANAN; GUPTA; TONELLI, 2015).

Outra maneira de caracterizar os Complexos fármaco-CDs é observando a interação da polarização do spin nuclear de um próton hóspede com os dos spins nucleares dos prótons da CD, através do relaxamento cruzado. O resultado dessa interação é chamado de efeito overhauser nuclear (NOE), e ocorre por meio de interação espacial. Uma variedade de técnicas, tais como Espectroscopia de efeito nuclear overhauser (NOESY), Espectroscopia de efeito heteronuclear overhauser (HOESY), espectroscopia de Efeito nuclear overhauser de estrutura rotacional (ROESY), e efeitos nucleares overhauser transferidos foram desenvolvidos, todos baseados em NOE, e freqüentemente são usados para caracterizar complexos de inclusão solúveis (UYAR *et al.*, 2006; LULA *et al.*, 2007; MARTÍNEZ *et al.*, 2007).

Tanto NOESY e ROESY mostram-se bastante úteis na visualização dessas interações, que existem em um intervalo de alguns Angströms. Quando os CDs interagem com as moléculas hóspedes para formar CIs, há uma interação não ligada e, portanto, um NOE deve ser notado em seus espectros de RMN. No entanto, quando há uma mistura simples separada por fase, não haveria essa interação molecular e, portanto, nenhuma NOE (WILLIAMSON, 2010).

3.4.2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura

A Calorimetria Diferencial de Varredura ou *differential scanning calorimeter* (DSC), também chamada de Calorimetria Exploratória Diferencial, é uma técnica que fornece informações sobre as transições térmicas de materiais, como fusão, cristalização e transições vítreas que são exclusivas do material observado. As moléculas de CDs, no entanto, não provocam transições térmicas (RIBEIRO *et al.*, 2008a).

A partir de mudanças/diferenças nas temperaturas de transição e nas entalpias, o DSC nos permite distinguir misturas físicas de complexos de inclusão não-estequiométricos e estequiométricos, desde que as moléculas hóspedes provoquem transições térmicas (RIBEIRO *et al.*, 2008a). Após a formação de complexos, as transições térmicas pertencentes à molécula hóspede desaparecem nas varreduras DSC, enquanto no caso de uma mistura física separada por fases, ocorrem transições térmicas das moléculas hóspedes (MOHAN *et al.*, 2009).

No caso de complexos não estequiométricos, algumas partes da molécula hóspede, residem fora da cavidade da CD, assim, não apenas suas transições térmicas são observadas, mas tipicamente, temperaturas elevadas e também com maiores valores de entalpia quando corrigidos para a massa de porções não incluídas das cadeias moleculares convidadas. Estas temperaturas elevadas e valores de entalpia são presumivelmente devido aos efeitos entrópicos produzidos pela interação entre as porções não incluídas da molécula convidados emergentes das cavidades das CDs hospedeiras (MOHAN *et al.*, 2009).

Por outro lado, os CIs totalmente cobertos não apresentam uma transição de fusão, devido ao isolamento de cadeias convidadas dentro das cavidades das CDs (NARAYANAM *et al.*, 2015). Já para as misturas físicas, as temperaturas de fusão e os valores de entalpia diminuem ligeiramente. Tendências similares de temperaturas de fusão decrescentes são atribuídas à interação deficiente entre as moléculas hóspede e a CD (MANOSROI *et al.*, 2005).

Uma grande desvantagem do DSC é que ele requer que as moléculas hóspedes sejam termicamente ativas, portanto, mudanças nos seus perfis de transição térmica podem ser observadas na formação do CI. Mas algumas moléculas de fármaco, mesmo puras, são amorfas e não sofrem quaisquer transições térmicas, e, portanto, não são adequadas para análise de DSC (NARAYANAN *et al.*, 2017).

O DSC pode ser usado para distinguir misturas físicas de Complexos de Inclusão através de mudanças nas temperaturas de transição, desde que as moléculas hóspedes passem por transições térmicas (NARAYANAN *et al.*, 2017). A inclusão do hóspede na cavidade do CD pode causar o desaparecimento do pico endotérmico, aparecimento de novo pico, alargamento ou mudança para diferentes temperaturas indicando uma mudança na estrutura cristalina (PERIASAMY; KOTHAINAYAKI; SIVAKUMAR, 2015).

3.4.2.5 Análise Termogravimétrica

Análises termogravimétricas (TGA) fornecem informações sobre os constituintes (incluindo múltiplos convidados) e suas proporções presentes no sistema através da análise de seus padrões de degradação. Assim, a TGA pode ser usada como uma excelente ferramenta para distinguir misturas físicas da molécula CD e hóspede de seus complexos de inclusão (NARAYANAM *et al.*, 2016). Além disso, a TGA pode ser usada para identificar complexos de inclusão com diferentes estequiometrias (NARAYANAN *et al.*, 2017).

Essa técnica determina mudanças da massa da amostra em função da temperatura e tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura. A variação na mudança da massa em relação à temperatura, (dm/dT) é gravado, em função do tempo ou temperatura. A curva resultante é a primeira derivada da curva TG, que fornece uma série de picos (ARAÚJO *et al.*, 2003).

A pequena quantidade de amostra utilizadas, rápidas leituras para estudo de estabilidade, e informações sobre propriedades físicas e químicas, fazem dessa técnica termoanalítica, uma ferramenta importante nos estudos de complexos de inclusão (ARAÚJO *et al.*, 2003). Entretanto, semelhante a DSC e FTIR, a TGA não pode ser usada para estimar quantitativamente a estequiometria das moléculas hóspede e hospedeira (NARAYANAN *et al.*, 2017).

3.4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica comumente usada para estudar a morfologia de materiais, incluindo CDs e seus CIs. Uma das principais aplicações da MEV na formulação complexos de Inclusão (CI) tem sido detectar as alterações morfológicas decorrente da complexação entre as moléculas hospedeiras (CD) e convidadas, que são únicas em comparação com componentes individuais ou misturas físicas de drogas (BRAGAGNI; MAESTRELLI; MURA, 2010). Uma maneira comum de caracterizar a formação bem-sucedida de CIs é observando o desaparecimento de características morfológicas das pequenas moléculas ou pela presença de morfologia de um único cristal, dependendo da combinação de CD e da molécula hospedeira escolhida (NARAYANAN *et al.*, 2017).

Por exemplo, a triacetil- β -ciclodextrina (TA- β CD) com cristais aglomerados de forma romboide, ao formar CI com hidrocloreto de prilocaína mostrou a presença de partículas com forma irregular que eram completamente diferentes dos componentes individuais, sugerindo a formação de CI (BRAGAGNI; MAESTRELLI; MURA, 2010). Da mesma forma, observou-se transformação da morfologia do cristal quando a barbigerona, formou um IC com HP- β -CD. Nesse caso, evidenciou-se a formação de um CI pela visualização de partículas com aspecto cuboide, corroborando a alteração morfológica causada na HP- β -CD, que por sua vez, tem uma forma esférica (QIU *et al.*, 2014).

É importante destacar que a MEV só pode fornecer evidência qualitativa para mostrar a formação do CI. Como a formação de CI pode ser afetada negativamente pelo

processamento da técnica, a MEV pode, na melhor das hipóteses, atuar como uma fonte de evidência secundária para confirmar a formação do CI (NARAYANAN *et al.*, 2017).

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.*, 2004). Nesse contexto, O desenvolvimento de um método analítico implica na necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos, assim como sua eficiência na rotina do laboratório, enquanto que a validação do método visa confirmar a confiabilidade e capacidade de desempenho do mesmo (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) define validação como a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos (INMETRO, 2003). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017).

Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (ICH, 2005; FDA, 2015; ANVISA, 2017).

Técnicas de separação como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) têm destaque na Química Analítica pela capacidade de identificação de compostos por comparação com padrões, purificação de compostos, separando-os de componentes de uma mistura, seja ela biológica, farmacêutica ou alimentícia (RIBANI *et al.*, 2004; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1997). Particularmente a CLAE

é largamente empregada por possuir vantagens como curto tempo de preparo da amostra a ser analisada; dados qualitativos e quantitativos podem ser obtidos para amostras de polaridades variadas em uma só corrida de análise e, permite várias formas de detecção, podendo aumentar a especificidade e o conteúdo de informações por ensaio (KARCHER *et al.*, 2005).

Os avanços nas estratégias analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), impulsionados por diversas variáveis, fornecem grande quantidade de dados durante o curso das medições analíticas (SAHU *et al.*, 2018). A CLAE é uma técnica de separação versátil com ampla variedade de aplicações. Contudo, a otimização dos métodos de CLAE é um processo complexo; já que diversas variáveis (pH da fase móvel, concentração de tampão, vazão, temperatura da coluna, comprimento de onda do detector, etc.) devem ser controladas simultaneamente para obter as separações desejadas (HEYDEN *et al.*, 2001). Consequentemente, surge a necessidade de uma compreensão mais profunda de tal método.

Durante décadas, o desenvolvimento de métodos de CLAE foi desenvolvido por meio de abordagem de tentativa e erro, aprimorada com conhecimento especializado, conhecimento e sabedoria do analista. O uso desse sistema tradicional durante a otimização do método envolve a alteração de um fator por vez, enquanto mantém os outros constantes, o que pode certamente alcançar a separação desejada, mas as condições ideais reais nunca poderiam ser prometidas. Essa abordagem costumeira de desenvolver um método de HPLC foi evidenciada não apenas como exagerada em termos de tempo, dinheiro e trabalho, mas também crítica para corrigir erros, imprevisíveis e até mesmo sem sucesso, uma vez que ajustar cada um de cada vez gera muitos dados brutos, o que dificulta a interpretação para a obtenção de um sistema ideal (SINGH; KUMAR; AHUJA, 2004).

Entretanto, as variáveis experimentais estão interligadas, dessa forma, um desenho experimental quimiométrico pode superar esse problema, planejando os experimentos de tal maneira que os dados sejam modelados eficientemente com número limitado de experimentos. O principal objetivo do planejamento experimental e, geralmente, estimar a influência dos fatores e suas interações na separação cromatográfica (SAHU *et al.*, 2018).

Na validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; robustez; limite de detecção e limite de quantificação (ICH, 2005; FDA, 2015; ANVISA, 2017). Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017; INDRAYANTO, 2018).

3.5.1 Seletividade

Os termos especificidade e seletividade são frequentemente usados de forma intercambiável. Entretanto, um método deve ser dito "específico" se fornecer uma resposta para apenas um único analito, enquanto o termo "seletivo" significa que o método fornece respostas para um número de entidades químicas que podem ser distinguidas umas das outras. Dessa forma, é dito que um método é específico quando ele apresenta 100 % de seletividade (BRESSOLE; BROMET-PETIT; AUDRAN, 1996).

A seletividade é definida ainda como “a medida em que o método pode ser usado para determinar os analitos particulares em misturas ou matrizes sem interferências de outros componentes de comportamento similar”. Sendo assim, considera-se o termo "seletividade" mais adequado (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014). A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (RIBANI *et al.*, 2004).

Para determinar a seletividade, a quantificação do analito em matrizes de teste contendo todos os componentes potenciais é comparada com a quantificação do analito apenas em solução. A seletividade do ensaio determina que o sinal obtido é devido ao analito de interesse e que não há interferência de outros componentes da matriz, impurezas ou produtos de degradação (TIWARI; TIWARI, 2010). Se a amostra contiver produtos de degradação, o ensaio deve ser capaz de distinguir o material desejado dos produtos de decomposição (RIBANI *et al.*, 2004).

Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004). A Conjunção do aparelho de CLAE com matriz de diodos ou Espectrometria de massas pode ser usada para determinar a pureza de um pico (TIWARI; TIWARI, 2010).

3.5.2 Linearidade

A linearidade é estabelecida pela demonstração de uma relação entre a resposta do detector e a concentração do analito (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017) ou ainda como a capacidade de fornecer resultados de medição que são diretamente proporcionais à

concentração do analito, ou são diretamente proporcionais depois de algum tipo de transformação matemática (YUWONO; INDRAYANTO, 2005; INDRAYANTO, 2018).

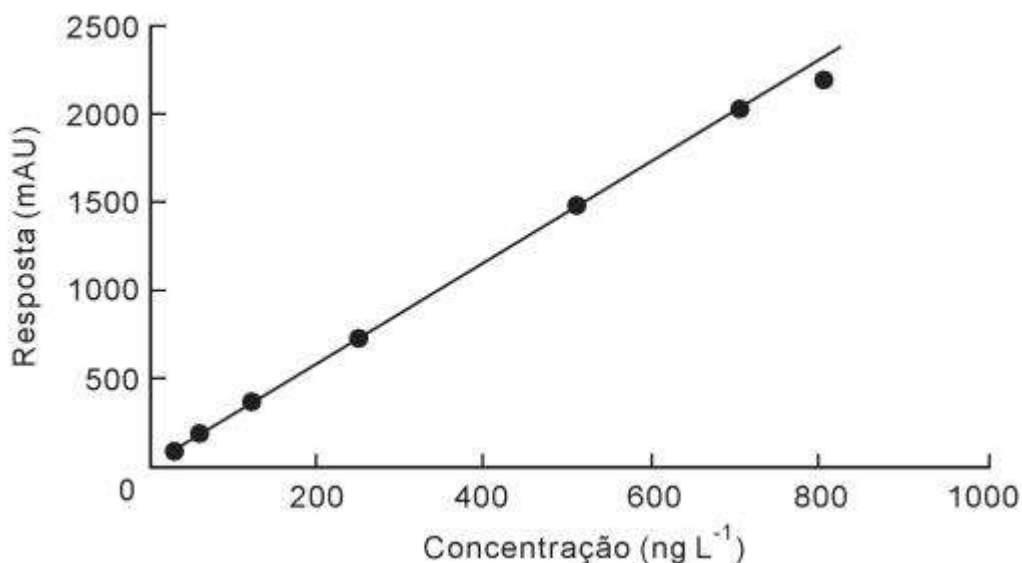
A linearidade do detector pode ser obtida diluindo a solução estoque do analito e medindo as respostas associadas, enquanto a linearidade do método analítico pode ser determinado fazendo uma série de concentrações do analito a partir de preparações de amostras independentes (pesagem) (ERMER; LANDY, 2002). Também é essencial que a curva linear de calibração básica seja obtida usando amostras independentes, e não usando amostras que foram preparadas por diluição (YUWONO; INDRAYANTO, 2005; INDRAYANTO, 2018).

A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação (r) ou o coeficiente de determinação (r^2), que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

Um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração (RIBEIRO *et al.*, 2008b). O coeficiente de determinação (r^2) é um parâmetro que permite avaliar a qualidade do ajuste nos modelos de regressão linear (SUBRAMANIAN; COUTINHO; SILVA, 2003). Charnet *et al.* (1999) esclarecem que o coeficiente de determinação r^2 é a proporção da variabilidade da variável resposta observados, explicada pelo modelo considerado em que o valor de r^2 pertence ao intervalo (0 a 1) e quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo considerado (CHARNET *et al.*, 1999).

Um exemplo de curva analítica pode ser visto na Figura 11. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Figura 11 - Determinação gráfica da linearidade através de uma curva analítica.



Fonte: Ribani *et al.* (2004).

As pressuposições de variância constante (homocedasticidade), normalidade e erros não correlacionados (independência) em modelos lineares visam facilitar a interpretação dos resultados, tornar as técnicas estatísticas mais simples e possibilitar testes de hipóteses. O não atendimento destas pressuposições pode afetar as conclusões tomadas com base nos modelos estabelecidos e nas técnicas de análise a eles associados (JOHNSON; WICHERN, 1998). A homocedasticidade é, na maioria das vezes, um requisito necessário para a análise de variância (ANOVA). O nível de significância para o teste de homogeneidade de variâncias é o p-valor do teste F na análise de variância da variável de dispersão (RIBOLDI *et al.*, 2014).

3.5.3 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (SHABIR, 2003). É também chamado de veracidade. É geralmente estabelecida medindo amostras de composição conhecida (amostras autênticas ou soluções preparadas artificialmente) em toda a faixa de concentrações esperadas e demonstrando que os valores estão dentro dos critérios pré-estabelecidos definidos pelo usuário (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017).

Uma estimativa da exatidão de um método envolve a análise de uma amostra com concentração conhecida e, em seguida, a comparação dos resultados entre o valor medido e o

valor real. Outras abordagens baseiam-se em determinações de recuperação percentual do analito conhecido adicionado a matrizes ou produtos em branco (ou seja, o método de adição padrão) (YUWONO; INDRAYANTO, 2005).

O método mais comum para determinar a precisão em estudos de produtos naturais é o método de recuperação dos picos, que consiste na adição (mistura) do analito à quantidades conhecidas da amostra e em seguida estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Na sequência, a análise é realizada em ambos os materiais, recuperados e não aproveitados; adicionalmente uma comparação entre a quantidade encontrada e a quantidade adicionada fornece a recuperação do método (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011; AOAC, 2017). A exatidão (% Recuperação) pode ser calculada pela Equação 7:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_f - C_o}{C_a} \times 100 \quad (7)$$

Onde C_o é a concentração original, C_f é a concentração recuperada e C_a é a concentração escolhida da curva (INDRAYANTO, 2018). O critério de aceitação para dados de recuperação é de 98 a 102% ou 95 a 105% para preparações de medicamentos. Um teste estatisticamente válido tal como *t*-teste, Doerffel-test, Wilcoxon-test pode ser usado para provar se não há diferença significativa entre o resultado do estudo de exatidão com o "valor verdadeiro" (YUWONO; INDRAYANTO, 2005).

Além da % de recuperação, uma curva de recuperação de concentrações medidas versus concentrações reais (nominais) deve ser construída. A inclinação da curva de recuperação não deve ser significativamente diferente de 1 (um), e a interceptação não deve ser significativamente diferente de 0 (zero) (YUWONO; INDRAYANTO, 2005; FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007; USP, 2013).

3.5.4 Precisão

A precisão reflete a capacidade de um método para fornecer medições consistentes e pode ser avaliado de várias maneiras. A determinação da precisão pode ser dividida em três categorias (YUWONO; INDRAYANTO, 2005; BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017; INDRAYANTO, 2018; SHEETS, 2018):

3.5.4.1 Repetibilidade

Também chamada de precisão intra ensaio, é uma medida da capacidade de um método de Cromatografia Líquida para fornecer medições consistentes durante um curto período de tempo, que geralmente está dentro de uma determinada sequência de execução ou amostra (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017). Significa a variação (ou falta relativa de) que surge executando a mesma amostra repetidamente dentro de um ensaio (variabilidade intra-ensaio), isto é, replicados em execução (SHEETS, 2018). Ela é avaliada medindo-se a precisão dos resultados de múltiplos testes e confirmando a adesão a critérios pré-definidos (YUWONO; INDRAYANTO, 2005; BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017; INDRAYANTO, 2018; SHEETS, 2018).

A Repetibilidade, esperada para dar o menor variação nos resultados é também definido como uma medida da variabilidade nos resultados quando uma medição é realizada por um analista único usando o mesmo equipamento ao longo de um curto prazo de tempo (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014).

3.5.4.2 Precisão Intermediária

É uma medida da capacidade de um método de fornecer medições consistentes dentro de um determinado laboratório quando o teste é realizado por diferentes analistas que usam equipamentos diferentes ou com diferentes lotes de reagentes em dias diferentes. A precisão intermediária avalia a variabilidade inter ensaio (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017; SHEETS, 2018). Para realizar um estudo de precisão intermediária, o número mínimo de amostras a serem analisadas deve ser de pelo menos seis determinações em três concentrações diferentes feitas em três momentos diferentes, fornecendo um total de 54 amostras (YUWONO; INDRAYANTO, 2005).

3.5.4.3 Reprodutibilidade

É uma medida da capacidade de um método de fornecer desempenho consistente ao longo do tempo em diferentes laboratórios, com diferentes analistas usando diferentes equipamentos. Esse é o mais difícil de avaliar, mas se aproxima mais do comportamento que o método exibirá durante sua vida útil (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017).

A replicação é essencial para obter estimativas confiáveis das características de desempenho do método, como precisão. Geralmente a precisão é expressa por parâmetros estatísticos que descrevem a dispersão dos resultados, tipicamente o desvio padrão (ou desvio padrão relativo), calculado a partir dos resultados obtidos pela realização de medições replicadas em um material sob condições especificadas (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014).

A avaliação da precisão requer replicar suficientemente as medições e as réplicas devem ser independentes, ou seja, toda a medição processo, incluindo quaisquer etapas de preparação da amostra, deve ser repetido. O número mínimo de replicações especificadas varia com diferentes protocolos, mas é tipicamente entre 6 e 15 para cada material usado no estudo. A decisão sobre as "condições especificadas" é um aspecto importante da avaliação da precisão das medições uma vez que as condições determinam o tipo de estimativa de precisão obtida (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014).

Outros parâmetros que devem ser testados no estudo de precisão são os testes de David, Dixon ou Grubbs e Neumann. O teste de David é realizado ao determinar se os dados de precisão são normalmente distribuídos. Testes discrepantes de os dados são realizados pelo teste de Dixon (se $n < 6-8$) ou pelo teste de Grubbs (se $n > 6-8$), enquanto o teste de tendência dos dados é realizado pelo teste de Neumann (KROMIDAS, 1999).

3.5.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito a partir da qual é possível deduzir a presença de um analito na amostra de teste, enquanto limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de um analito que pode ser determinada com o grau especificado de exatidão e precisão (INDRAYANTO, 2018). Ambos são estabelecidos de forma similar, ou seja, através da avaliação visual do pico, através de ruídos ao sinal do pico e calculados a partir da resposta e do desvio padrão do declive da curva de calibração (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017). Entretanto, a melhor maneira de determinar LD instrumental é desenvolvendo curva de regressão linear com concentrações relativamente baixas do composto alvo em um solvente adequado (FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 2007).

Assim como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Esse critério é uma boa regra a ser seguida, porém não se deve esquecer que a determinação do LQ representa um compromisso

entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. O melhor caminho, portanto, para resolver este problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ (RIBANI *et al.*, 2004). Dessa forma, o LD pode ser calculado, através do método baseado em parâmetros da curva analítica, conforme a Equação 8 (INDRAYANTO, 2018):

$$LD = 3,3 \times (s/S) \quad (8)$$

Na qual s é o erro padrão da curva de alibração, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; YUWONO; INDRAYANTO, 2005; INDRAYANTO, 2018).

Na prática, o LOQ é calculado pela maioria das convenções como sendo a concentração do analito correspondente ao desvio padrão obtido em níveis baixos multiplicado por um fator, kQ . O padrão IUPAC valor para kQ é 10 (IUPAC, 1995) e se o padrão desvio é aproximadamente constante a baixa concentrações este multiplicador corresponde a um desvio padrão relativo (DPR) de 10% (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014). Dessa forma, os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LQ, a partir da Equação 9 (RIBANI *et al.*, 2004; YUWONO; INDRAYANTO, 2005):

$$LD = 10 \times (s/S) \quad (9)$$

Ademais, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em LD e LQ mais baixos. Além disso, a determinação cromatográfica desses parâmetros deve considerar tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna. O melhor caminho para resolver este problema do

cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. (RIBANI *et al.*, 2004; YUWONO; INDRAYANTO, 2005).

3.5.6 Robustez

A robustez do método é a capacidade do método de fornecer desempenho adequado quando são feitas pequenas alterações. Para os métodos de Cromatografia Líquida, é tradicionalmente demonstrado medindo o efeito de pequenas alterações deliberadas nos parâmetros no desempenho do método (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; BORMAN *et al.*, 2011; FDA, 2015; BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017). Alguns fatores críticos que podem ser selecionados são: peso da amostra de teste, solvente, volume de solvente, temperatura de extração, tempo de extração, agitação, composição da fase móvel, coluna (OAO, 2013), além de pH, taxa de fluxo, estabilidade dos reagentes (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

A robustez é geralmente avaliada durante o desenvolvimento do método, no qual os pesquisadores devem determinar os fatores críticos ou variáveis que poderiam influenciar o desempenho do método proposto. Estudos multivariados são frequentemente realizados quando se avalia a robustez do método (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; BORMAN *et al.*, 2011; FDA, 2015; OAO, 2017; BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2017).

Através de “teste de robustez” é possível identificar as variáveis no método que têm o efeito mais significativo e garantir que, ao usar o método, eles são controlados. Sempre que houver necessidade de aperfeiçoar o método, melhorias provavelmente podem ser feitas concentrando-se nas partes do método reconhecidamente críticas (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014). O teste de robustez é realizado no final do desenvolvimento ou no início da validação. Quando a robustez do método é considerada aceitável, o método pode ser validado, podendo ser aplicados de forma rotineira. Caso contrário, o método deve ser adaptado ou reconstruído (DEJAEGHER; VAN DER HEYDEN, 2009).

Nos estudos de robustez, para avaliar a vulnerabilidade da resposta nos métodos analíticos otimizados, utilizam-se os métodos quimiométricos. Experimentos fatorial completo de dois níveis e modelos fatoriais fracionários, matriz Plackett-Burman e outros projetos, incluindo algumas metodologias de superfície de resposta, podem ser usados em testes de robustez (FERREIRA *et al.*, 2017).

O número de fatores pode influenciar diretamente a escolha do planejamento ideal, por exemplo, o planejamento fatorial completo de dois níveis permite uma avaliação preliminar

dos fatores pelo desenvolvimento de modelos lineares (PARODI *et al.*, 2015; DINIZ; TARLEY, 2015; AMPATZOPOULOS; KOUSKOURA; MARKOPOULOU, 2015; JEMMALI *et al.*, 2016). No entanto, se o número de fatores for grande, esse design é muito inadequado (FERREIRA *et al.*, 2017).

As condições críticas dos fatores são alcançadas usando as metodologias de resposta de superfície, tais como: matriz de Doehlert (RODRIGUES *et al.*, 2014; HEIDARIZADI; TABARAKI, 2016; SANTOS *et al.*, 2016), central composta (BENAVIDES *et al.*, 2014; DI CARRO; ARDINI; MAGI, 2015; HASHEMI; SHAMSIPUR; BARATI, 2015), Box-Behnken (SAYAR *et al.*, 2014; WINGERT, 2016; FATTAHI; RAHIMI, 2016) e experimentos fatorial de três níveis (RAKIC *et al.*, 2014; D'ARCHIVIO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016) que permitem a obtenção de modelos quadráticos. Todas essas ferramentas fornecem melhores resultados do que a univariada, permitindo avaliar vários fatores, com um baixo número de experimentos. Contudo, depois de escolher o desenho experimental apropriado para o teste de robustez, os experimentos devem ser realizados em uma ordem aleatória (FERREIRA *et al.*, 2017).

3.6 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A *Food and Drug Administration (FDA)* refere-se a nanotecnologia como materiais que têm pelo menos uma dimensão na gama de tamanhos de aproximadamente 1 a 100 nm nanômetro (nm) que apresentem segurança, eficácia, qualidade e que causem impactos na saúde pública (FDA, 2017). De acordo com a recomendação da *European Commission's science and knowledge service*, considera-se “nanomateriais”, material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas, em estado não ligado ou agregado ou aglomerado e onde, para 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho numérico, uma ou mais dimensões externas estiverem na faixa de tamanho 1 nm - 100 nm (EC, 2011).

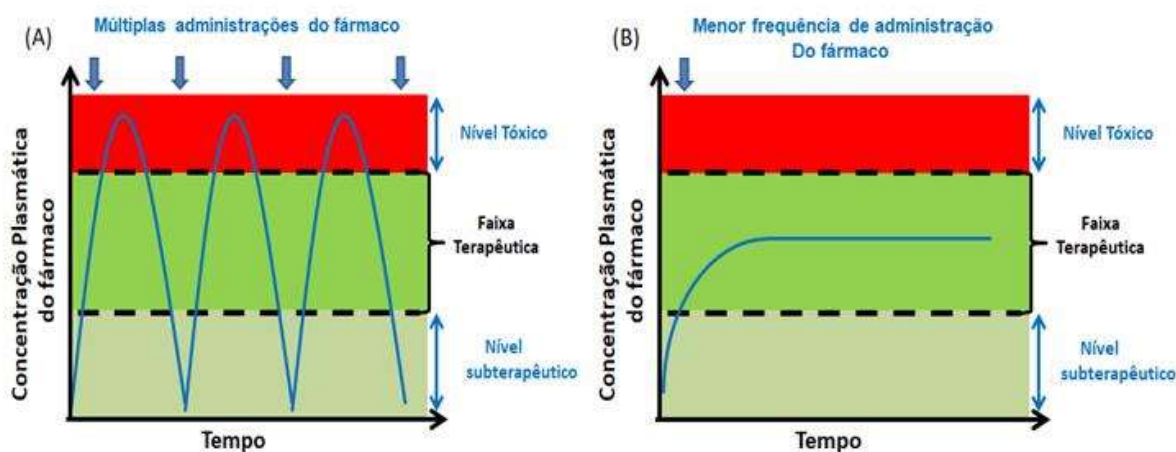
Adicionalmente, a nanotecnologia engloba material ou produto final, projetado para exibir propriedades ou fenômenos, incluindo propriedades físicas, químicas ou efeitos biológicos, que são atribuíveis a sua dimensão, mesmo que essas dimensões caiam fora da escala da nanoescala, até um micrômetro (1.000 nm) (FDA, 2017). Na área das ciências farmacêuticas a nanotecnologia está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de vetores (sistemas liberação controlada de fármacos, descritos com “drug delivery systems” (DDS) que oferecem vantagens como a possibilidade de veicular fármacos

insolúveis em sistemas aquosos e redução da sua toxicidade ativos (SAKATA *et al.*, 2007; BUNJES, 2011; MUDSHINGE *et al.*, 2011; CE *et al.*, 2016).

As terapias convencionais vem sendo progressivamente substituídas por medicamentos baseados em terapias avançadas, tal como a nanotecnologia. Especial atenção é dada ao lidar com as restrições associadas à entrega tradicional de fármacos, na qual, alguns dos obstáculos mais comuns encontrados são a baixa biodisponibilidade, baixa estabilidade, sabor amargo e odor desagradável de certos agentes ativos (SAKATA *et al.*, 2007; BUNJES, 2011; MUDSHINGE *et al.*, 2011; CE *et al.*, 2016).

Dessa forma a encapsulação desempenha um papel vital na superação dos obstáculos acima mencionados. A degradação de agentes ativos pode ser evitada através da sua encapsulação. Além disso, as tecnologias de encapsulamento também ajudam na obtenção de formulações de liberação controlada e direcionada (MUDSHINGE *et al.*, 2011; IQBAL *et al.*, 2015; CE *et al.*, 2016; PATHAK; VAYDIA; PANDLEY, 2019). Contudo, a maior vantagem dos DDSs é certamente devido ao controle da janela terapêutica, como mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Diagrama esquemático da janela ou faixa terapêutica.



(A) administrações múltiplas de um fármaco veiculado por um medicamento convencional e (B) administrado através de um sistema de liberação controlada. Fonte: autor próprio.

Na administração de fármacos, através dos medicamentos convencionais, é difícil manter o nível terapêutico adequado em termos de concentração plasmática e, portanto, administrações repetidas são frequentemente necessárias, resultando em resistência aos fármacos, riscos de toxicidade e, eventualmente, inconveniente para os pacientes (CHOI *et al.*, 2018). Por outro lado, a administração através de um sistema de liberação controlada mantém a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica permitindo que sua eficácia

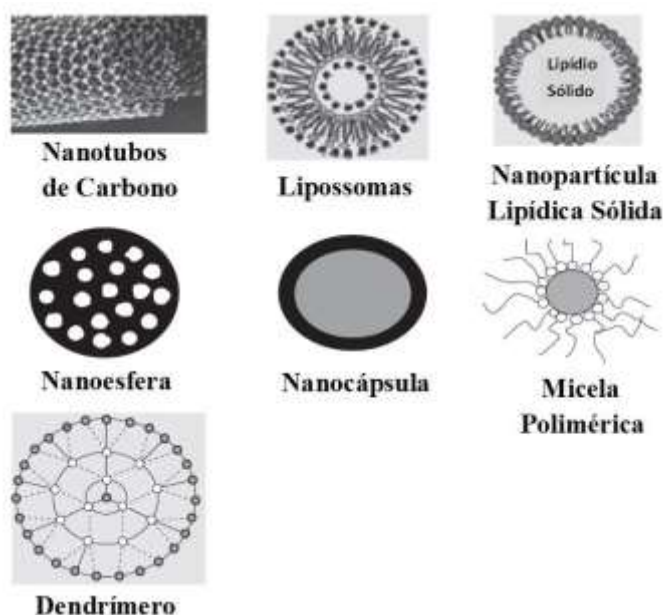
seja mantida nas concentrações plasmáticas requeridas com uma única administração, fato o que pode subsequentemente minimizar as desvantagens e efeitos secundários anteriormente mencionados devido a administrações repetidas (CHOI *et al.*, 2018).

Além de desempenharem um papel importante na veiculação do fármaco ao alvo terapêutico, alguns nanocarreadores são capazes de superar a resistência que algumas células apresentam a determinados fármacos. Outra utilidade bastante explorada desses nanosistemas é o fato de atravessarem as barreiras hematoencefálica e intestinais, ampliando assim a eficácia terapêutica das moléculas bioativas (PATHAK; VAIDYA; PANDEY, 2019).

Em geral, a dose de fármaco em nanosistemas é menor em comparação aos sistemas convencionais; no entanto, com o auxílio do direcionamento, uma maior concentração é mantida no local alvo (WILCZEWSKA *et al.*, 2012). Além disso, através da administração de formulações multifuncionais de escala nanométrica, a adesão do paciente pode ser significativamente melhorada (MCNEIL *et al.*, 2009).

Os nanosistemas possuem constituições variadas; eles podem ser sintetizados a partir de proteínas, lipídios como dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), carboidratos, e numerosos polímeros naturais e sintéticos como poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli (etileno óxido), poli (alquil cianoacrilato), entre outros. (MCBAIN; YIU; DOBSON, 2008; BEIJA *et al.*, 2012; McCLEMENTES, 2015). Vários são os tipos de DDSs coloidais, a exemplo tem-se, dendrímeros, micelas poliméricas, lipossomas, microcápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanocápsulas e nanoesferas (McCLEMENTES, 2015; PATHAK; VAYDIA; PANDEY, 2019). Também dispõe-se de nanopartículas inteligentes (KIM; DJAZAYERI; ZEINELDIN, 2011) e nanopartículas gelificadas (KIRILOV *et al.*, 2008). A Figura 13 mostra a estrutura de alguns dos nanosistemas disponíveis atualmente.

Figura 13 - Sistemas de Liberação Controlada.



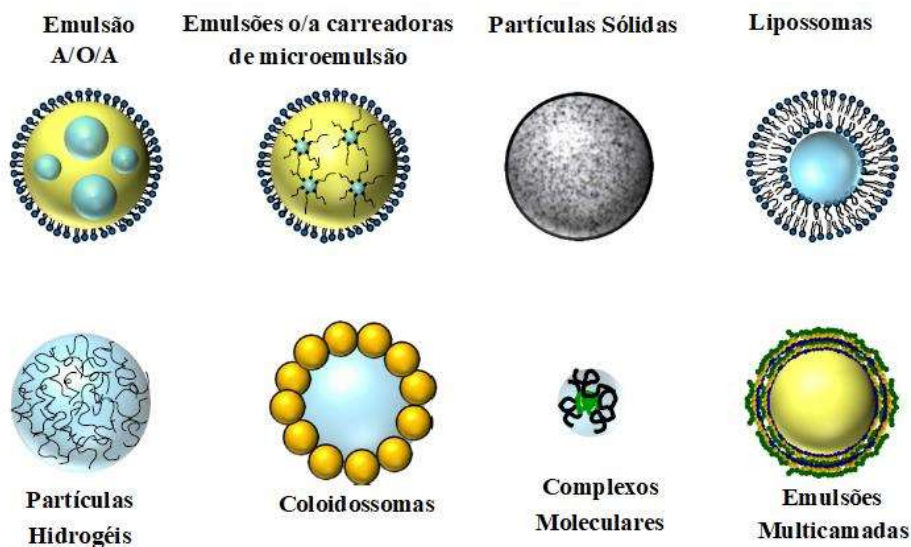
Fonte: Adaptado de Galvéz; Ruiz e Clares (2011).

Na última década, houve grandes avanços no desenvolvimento de sistemas coloidais para encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos (MCCLEMENTS, 2010; YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014; MASWAL; DAR, 2014; FATHI; MARTIN; MCCLEMENTS, 2014; JOYE; MCCLEMENTS, 2014). Tipicamente, o componente bioativo lipofílico é misturado com uma fase adequada de óleo ou tensoativo, e depois convertido numa dispersão coloidal, tal como uma microemulsão, lipossoma, ou nanoemulsão. Essas dispersões coloidais podem então ser usadas como blocos de construção para criar estruturas mais complexas, como emulsões multicamadas, emulsões múltiplas, coloidossomas ou partículas de hidrogel preenchidas (MCCLEMENTS, 2010; MCCLEMENTS, 2012; TROJER *et al.*, 2013; TING *et al.*, 2014).

Por outro lado, há poucos sistemas de liberação, economicamente e biologicamente viáveis, disponíveis para encapsular, proteger e liberar componentes bioativos hidrofílicos, tais como conservantes, vitaminas, nutracêuticos e fármacos hidrofílicos (MCCLEMENTS, 2014). Mesmo assim, há muitas aplicações dentro da indústria de alimentos e outras indústrias onde sistemas de entrega oral para bioativos hidrofílicos são urgentemente necessário, por exemplo, para mascarar o sabor dos péptidos amargos (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2010), para proteger cores ou aromas solúveis em água durante o armazenamento (SANTOS *et al.*, 2013), para melhorar a biodisponibilidade de vitaminas solúveis em água, nutracêuticos ou produtos farmacêuticos (FANG *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2012; MARKMAN; LIVNEY,

2012; ISAILOVI *et al.*, 2013), e para fornecer bioativos hidrofílicos para determinadas regiões do trato gastrointestinal (TEOH *et al.*, 2011). Alguns dos nanosistemas atualmente em estudo para a veiculação de moléculas hidrofílicas são ilustrados na Figura 14.

Figura 14 - Sistemas de distribuição que podem ser usados para encapsular, proteger e distribuir componentes bioativos hidrofílicos.



Fonte: Adaptado de MCClements (2015).

Atualmente, os sistemas de liberação controlada estão disponíveis para administração de fármacos por via oral, transdérmico, epidérmico, nasal, mucoadesivo, parenteral, além de sistemas implantáveis (KOHRS *et al.*, 2019).

A via oral é a mais comum e amplamente aceita para a administração de fármacos, porém o trato gastrointestinal (TGI) apresenta várias barreiras químicas e enzimáticas que afetam a entrega oral de fármacos (DESAI; DATE; PETRAVALI, 2012). As consequências são, por exemplo, baixa permeabilidade da mucosa para moléculas grandes e hidrofílicas, uma janela de absorção estreita em regiões particulares do trato gastrointestinal, falta de estabilidade no ambiente gastrointestinal, resultando em uma decomposição antes da sua absorção e baixa concentração dissolvida de princípio ativo nos fluidos gastrointestinais (TAO; DESAI, 2005; BHASAKARAN; MORIS; ROUT, 2012).

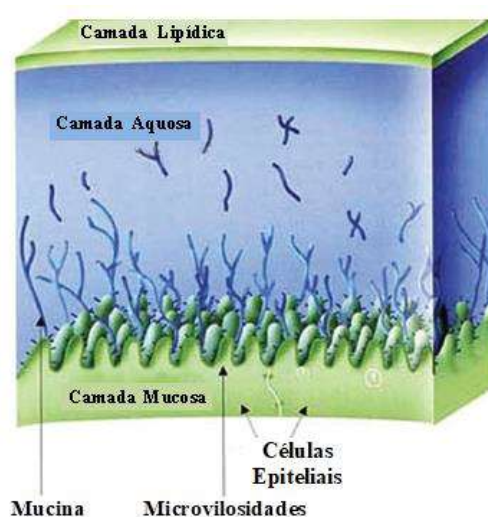
Fármacos como eritromicina e o candesartan cilexetila são submetido a degradação em pH ácido que afeta significativamente biodisponibilidade oral. Além disso, várias enzimas (esterases, lipases) presentes no TGI resultam na degradação de muitos fármacos como ramipril (SHAFIQ *et al.*, 2007), ezetimiba (BALI; ALI; ALI, 2010) e (cefpodoxime proxetil)

(NICOLAOS *et al.*, 2003). Além disso, a biodisponibilidade oral de várias moléculas terapêticamente ativas é consideravelmente reduzida devido ao alto grau de metabolismo hepático de primeira passagem. Finalmente, os transportadores de efluxo de drogas, como a glicoproteína-P, também responsável pelo efluxo de várias fármacos como a digoxina, paclitaxel e doxorrubicina do local de absorção também é uma frequente causa de baixa biodisponibilidade oral (DATE *et al.*, 2010).

Apesar de vários mecanismos que justifiquem a baixa biodisponibilidade oral de moléculas ativas já tenham sido descritos, a mucosa gastrointestinal é a principal barreira para a absorção de moléculas do lúmen intestinal para a circulação sistêmica (BUDDOPALLI; MOHAMMED; BANJI, 2010).

A membrana mucosa do trato gastrointestinal (Figura 15) é constituída por camada de tecido conectivo (a lâmina própria) acima da qual é uma camada epitelial, cuja superfície é geralmente úmida pela presença de uma camada de muco. O epitélio pode ser camada única (por exemplo, estômago, intestinos delgado e grosso) ou multicamadas/estratificadas (por exemplo, no esôfago). O primeiro contém células caliciformes que secretam muco diretamente nas superfícies epiteliais; o último contém ou são adjacentes a tecidos que contenham glândulas como as glândulas salivares que secretam muco para o superfície epitelial. Os principais componentes de todos os géis de muco são glicoproteínas da mucina, lipídios, sais inorgânicos e água, a esta representando mais de 95% do seu peso, tornando eles um sistema altamente hidratado (SMART, 2005).

Figura 15 - Estrutura da Membrana Mucosa.



Fonte: Adaptado de Buddopalli; Mohammed e Banji (2010).

A camada de muco gastrointestinal possui características elásticas, viscosas e pegajosas, sendo uma barreira primária que rapidamente captura e remove partículas estranhas. Moléculas com permeabilidade limitadas através da barreira mucosa serão rapidamente removidos do local de entrega, o que resulta em menor tempo de permanência no trato gastrointestinal e limitação eficaz para o fornecimento oral de fármacos (ENSIGN *et al.*, 2012; SHAN *et al.*, 2015).

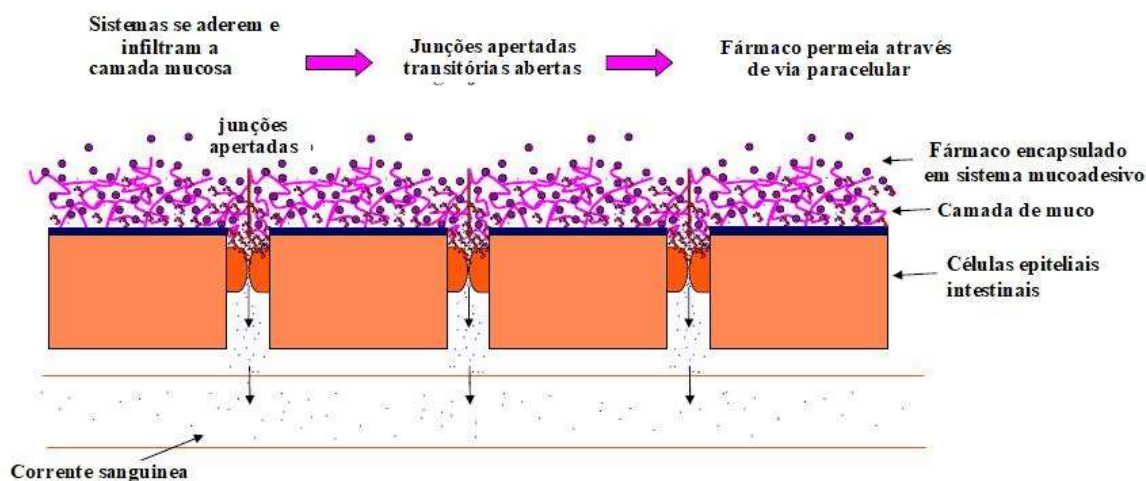
Uma estratégia para superar a baixa absorção pelas membranas do TGI é o uso de sistemas de escala nano ou micrométrica com propriedades bioadesivas ou mucoadesivas. Bioadesão é definida como a adesão de macromoléculas sintéticas ou naturais, como polímeros ao tecido biológico. O processo de mucoadesão é caracterizado por duas etapas: primeiro, o contato inicial entre a formulação e a superfície do tecido e, em segundo lugar, a formação de interações químicas como ligações de hidrogênio, interações não-covalentes e iônicas como a mucosa (ANDREWS; LAVERTI; JONES, 2009; BODUPALLI *et al.*, 2010).

Vários estudos, comprovando a eficácia de sistemas de liberação controlada com propriedades mucoadesivas para administração por via oral já foram publicados. Dessa forma já existem lipossomas revestidos com quitosana (TACKEUCHI *et al.*, 2005); dispositivos poliméricos para a administração de insulina (BANERJEE; LEE; MITRAGOTRI, 2016); nanopartículas revestidas de quitosana (DESAI; DATE; PETRAVALI, 2012; CHEN *et al.*, 2013; KHANAL *et al.*, 2016; KHANG *et al.*, 2017); microcápsulas revestidas de quitosana (SANNA *et al.*, 2015); microesferas revestidas de quitosana (CHEN *et al.*, 2017); dispositivo polimérico para liberação intestinal (KIRSCH; HANKE; WEITSCHIES, 2017); prolipossomas (NEKKANTI *et al.*, 2016), entre outros.

Os sistemas de liberação de fármacos com propriedades mucoadesivas oferecem várias vantagens em relação a outros sistemas de liberação controlada oral em virtude do prolongamento do tempo de retenção do fármaco no TG. Dentre as vantagens podemos destacar o direcionamento do fármaco a um local específico com consequente aumento na absorção dos fármacos pelo TGI (PUNITHA; GIRISH, 2010). As principais estratégias empregadas no desenvolvimento de sistemas com propriedades mucoadesivas estão relacionadas com a capacidade do sistema em ficar aderido ao muco ou à pele. Para tanto o material deve interagir com os componentes do muco ou alterar sua estrutura por estímulos fisiológicos como pH e temperatura. Entretanto, a eficiência de um sistema com propriedades mucoadesivas não está só na sua capacidade de aderir à mucosa durante um tempo, mas também na capacidade de liberar o fármaco nesta mucosa (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

Uma importante atenção é dada à melhoria do transporte paracelular de fármacos hidrofílicos (KOTZE *et al.*, 1998; LAMPRECHT *et al.*, 2006). O transporte de macromoléculas hidrofílicas através da via paracelular é, no entanto, severamente restringido pela presença de junções apertadas que estão localizados no aspecto luminal do epitélio celular (BALLARD; HUNTER; TAYLOR 1995). Nesse contexto, polímeros mucoadesivos foram utilizados para o auxílio da absorção intestinal de macromoléculas hidrofílicas. Assim, os fármacos hidrofílicos liberados dos sistemas mucoadesivos podem então permear através do caminho paracelular para o corrente sanguínea, atingindo assim a circulação sistêmica (LIN *et al.*, 2007) (Figura 16).

Figura 16 - Mecanismo presumido do transporte paracelular de fármacos hidrofílicos para a corrente sanguínea usando nanopartículas revestidas com quitosana (CS).



Fonte: Adaptado de Lin *et al.* (2007).

Os vários polímeros mucoadesivos que foram utilizados para o desenvolvimento de sistemas de administração oral incluem quitosana, poli (ácido acrílico), alginato, poli (ácido metacrílico) e carboximetil celulose de sódio (BUDDOPALLI; MOHAMED; DAVID BANJI, 2017; KIRSCH; HANKE; WEITSCHIES, 2017). No entanto, um sistema de transporte, deve, além de fornecer mucoadesão, proteger os fármacos do ambiente hostil no estômago e no intestino delgado, se administrado por via oral (RAMADAS *et al.*, 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A oncocalixona A (onco A) foi extraída de partes do caule da planta *Cordia oncocalyx* Taub (Boraginaceae), coletado na cidade de Pentecoste, no estado do Ceará, Brasil. A espécie foi identificada pelo professor Afranio Gomes Fernandes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, e o espécime-testemunho (nº 18459) foi depositado no Herbário Prisco Bezerra. A onco A obtida através de extrações sucessivas com hexano e EtOH. Após remoção do solvente, o resíduo obtido do extrato etanólico foi dissolvido em água e a solução aquosa resultante foi extraída com CHCl_3 . O resuo do extrato de CHCl_3 foi submetido a separação em uma coluna cromatográfica de sílica gel, onde o sistema foi eluído com hexano, CHCl_3 , AcOEt e MeOH. A fração de AcOEt, separou a maior quantidade de Onco A, que foi isolada e purificada por cristalização e recristalização (PESSOA *et al.*, 1993; PESSOA *et al.*, 1995).

4.1.1 Matérias-primas

- ✓ Ácido acético glacial, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Ácido bórico, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Acetona, Fmaia – São Paulo, Brasil;
- ✓ Acetonitrila, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Ácido clorídrico, Vetec – Rio de Janeiro, Brasil;
- ✓ Ácido trifluoracético, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Alginato de Sódio, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ β -ciclodextrina (β -CD), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Brometo de potássio (KBr), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Cloreto de cácio, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Cloreto de sódio, Vetec – Duque de Caxias, Brasil;
- ✓ Etanol, Fmaia – São Paulo, Brasil;
- ✓ Éter sulfobutílico- β -ciclodextrina (SBE- β -CD), CyDex Pharmaceuticals, Kansas, EUA;
- ✓ Fosfatidilcolina de soja (98%), Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha;
- ✓ Fosfato de Potássio dibásico, Vetec – Rio de Janeiro, Brasil;

- ✓ Fosfato de potássio monobásico, Vetec – Rio de Janeiro, Brasil;
- ✓ 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Metanol grau HPLC, metanol grau HPLC,
- ✓ n-octanol, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- ✓ Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), Flores & Ervas, Piracicaba, Brasil;
- ✓ Óleo de soja, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- ✓ Óxido de deutério (D₂O) (99,96%), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- ✓ PEG-4000 (Polietilenoglicol),
- ✓ Poli-caprolactona (PM 14.000 Da, viscosidade 400 - 1000 mPa.s), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA); Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- ✓ Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), Birmingham Polymers, Alabama, USA;
- ✓ Quitosana (CS, 75-85% desacetilada, Mw 50.000-190.000 Da, viscosidade 20-300 cP), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- ✓ Sódio 3-(trimetilsilil) propionato-d₄ (99%), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA;
- ✓ Triglicerídeos de cadeia média, All Chemistry, São Paulo, Brasil;
- ✓ γ -ciclodextrina (γ -CD), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

4.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- ✓ Agitador magnético Mag Mixer, modelo M-41, Yamato Scientific CO, Tóquio, Japão;
- ✓ Agitador mecânico, modelo LR 51 B, Yamato Scientific CO, Tóquio, Japão;
- ✓ Analizador de partículas, ZetaSizer Nano-ZS90, Malvern, Worcestershire, UK;
- ✓ Analisador Térmico Simultâneo (TGA/DSC), Mettler Toledo AG, TGA/DSC 2 Star^e System, Schwerzenbach, Suíça;
- ✓ Balança analítica, modelo AY 220, Shimadzu, São Paulo, Brasil;
- ✓ Balança semianalítica, modelo AD500S, Marca Marte, São Paulo, Brasil;
- ✓ Unique USC-750, Indaiatuba, Brasil;
- ✓ Centrífuga Refrigerada, modelo KR 20000 T, Kubota, Tóquio, Japão;
- ✓ Cromatógrafo líquido, Alliance 2625, Waters, Miliford, EUA;
- ✓ Espectrômetro Vertex 70, Bruker Optics, Ontario, Canadá;
- ✓ Espectrômetro de RMN de 400MHz, Varian, Santa Clara, USA;
- ✓ Liofilizador, FTS Systems, Nova York, Estados Unidos;

- ✓ Metalizador, modelo Q150T ES, Quorum Technologies Ltd, Ashford Kent, Inglaterra;
- ✓ Microcalorímetro de Titulação Isotérmica, ITC-200 MicroCal, GE, Boston, USA;
- ✓ Micoencapsulador, B395 Pro, Buchi Labortechnik AG, Falwil, Switzerland;
- ✓ Microscópio eletrônico de varredura, Quanta 200 FEG, FEI, Hillsboro, EUA
- ✓ pHmetro, modelo K 39 0014 P, Kasvi, Curitiba, Brasil;
- ✓ Pipetas automáticas, modelo LM 1000, LABMATE Soft, Polônia;
- ✓ Purificador de água ultrapura, modelo MilliQ Q-POD, Merck Millipore, Ziefen, Suíça.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento do Método Analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) para Quantificar Onco A

4.2.1.1 Condições Cromatográficas

A detecção cromatográfica da onco A foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m, XBridge, Waters Corporation, Milford, EUA). Um módulo de separação Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, EUA) equipado com um detector UV-Vis 2489 e um detector com matriz de fotodiodos (PDA) 2998 usado para a análise de CLAE.

O comprimento de onda de detecção foi estabelecido em 283 nm, que foi o nível máximo de absorbância observado para onco A. A fase móvel isocrática consistiu em acetonitrila: água acidificada (0,05% ácido trifluoroacético) pH = 3 (30:70) (v/v) e um fluxo de 0,7 mL.min⁻¹ a 25 °C. Amostras de 20 μ L foram introduzidas no sistema de HPLC a cada 10 min. A fase móvel e as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de nylon de 0,2 μ m (Merck Millipore, Billerica, EUA) antes da utilização. Os dados cromatográficos foram monitorados e analisados usando o software Empower 2 (Milford, EUA).

4.2.1.2 Preparo da Amostra

Preparou-se uma solução mãe de onco A (1 mg.mL^{-1}) em acetonitrila, colocou-se num frasco âmbar hermeticamente selado. A Curva padrão da onco A com concentrações de 0,5, 1, 2, 4, 8, 10 e $20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada a partir da solução estoque por diluições adequadas com a fase móvel a 25°C .

4.2.2 Validação do Método Desenvolvido

A validação do método analítico foi realizada por meio das figuras de mérito a seguir: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008b; VELOSO *et al.*, 2009). Os parâmetros analíticos destas etapas da validação foram realizados conforme a Conferência Internacional de Padronização (*Internacional Conference on harmonization*, ICH, 2005) de acordo com o guia *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, Food and Drug Administration (FDA, 2015) através do *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry: Contains Nonbinding Recommendations*, e a Resolução nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que abordam a validação de métodos analíticos. Todas as etapas foram realizadas no mínimo em triplicata.

4.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método analítico foi avaliada pela análise de onco A ($4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) em solução tampão em diferentes (pH 5,5, 7,0 e 9,0), octanol e óleos (copaíba, soja e TCM). Verificou-se a ocorrência de interferentes presentes nas amostras que possam eluir no mesmo tempo de retenção da onco A, garantindo assim, que o pico obtido, relativo à molécula, é exclusivo da mesma. Os ensaios foram realizados em seis execuções independentes para cada matriz testada. A área do pico e o tempo de retenção foram utilizados como parâmetros para avaliar a capacidade do método na separação dos picos da onco A de compostos presentes na matriz.

4.2.2.2 Linearidade

A solução estoque de onco A (1 mg.mL^{-1}) foi diluída com a fase móvel para fornecer soluções com concentrações de 0,5, 1, 2, 4, 8, 10 e $20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva padrão foi ajustada usando a regressão linear de mínimos quadrados, ponderados pelo inverso da resposta, usando a área do pico onco A. Os testes de significância e proporcionalidade do coeficiente angular foram realizados por variância residual utilizando o teste t de Student ($\alpha = 0,05$). Os resíduos foram calculados com base na diferença entre valores teóricos e experimentais da curva padrão. A homocedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste complementar de Wilcoxon.

4.2.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as recomendações oficiais para produtos farmacêuticos da curva padrão do onco A (ICH, 2005). LD foi diferenciado de forma confiável do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva padrão (sinal maior ou igual a 3,3). O LQ foi determinado como a menor quantidade do analito que foi reproduzida e calculada pela razão entre o desvio padrão da resposta e a inclinação da curva padrão onco A multiplicada por 10.

4.2.2.4 Efeito Residual

O efeito residual foi determinado por meio de uma análise da injeção de fase móvel após a injeção da onco A na concentração máxima da curva padrão ($20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). A possível presença de pico residual do fármaco no cromatograma obtido utilizando a fase móvel foi calculada como a percentagem de resíduo relacionada com onco A remanescente na coluna. O ensaio foi realizado com seis injeções, independentes, da fase móvel após corrida da onco A.

4.2.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi verificada por meio da recuperação da concentração de três pontos da curva analítica em triplicata, totalizando 9 determinações. Foram selecionados as concentrações mínima ($0,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), médio ($4 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e mais elevada ($20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). As concentrações de onco A de cada amostra foram obtidas por meio da utilização da equação da regressão linear correspondente à curva analítica. As concentrações obtidas através da curva

analítica foram utilizadas para o cálculo do desvio padrão relativo em relação aos valores teóricos e a Equação 10 foi utilizada para determinar a proximidade dos pontos obtidos experimentalmente e os valores teóricos.

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (10)$$

4.2.2.6 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária em dias separados (inter-dia) e por diferentes analistas. A repetibilidade foi investigada pela injeção de amostras, em triplicata, das soluções de onco A em três diferentes concentrações (0,5, 4,0 e 20 µg.mL⁻¹). A precisão inter-dia foi avaliada separadamente pela injeção de três diferentes concentrações da molécula em dias diferentes. A precisão intermediária também foi avaliada pela injeção de amostras preparadas por dois analistas diferentes. A repetibilidade e a precisão intermediária foram expressas como desvio padrão relativo (% DPR).

4.2.2.7 Robustez

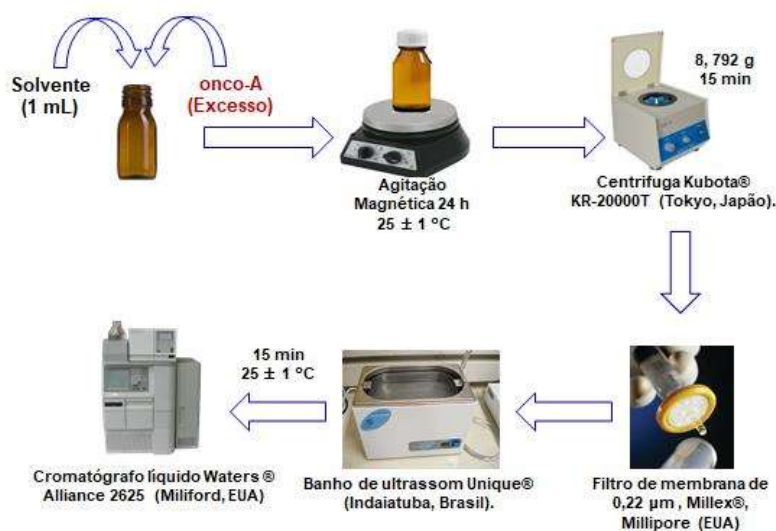
A robustez do método foi avaliada pelo delineamento experimental de Box-Behnken. Com base nas condições cromatográficas finais com pequenas alterações (cerca de 5%), três variáveis independentes em baixo, médio ou alto nível foram atribuídas à vazão (x_1) (0,66, 0,70 e 0,74 mL.min⁻¹), temperatura da coluna (x_2) (23,7, 25,0 e 26,3 °C) e composição da fase móvel (acetoneitrilo / água acidificada (x_3)) (33,5: 66,5, 30:70 e 26,5: 73,5). A precisão e o tempo de retenção do onco A foram escolhidos como as variáveis de resposta dependentes. Experimentos randomizados (n = 15) foram realizados para a robustez do método de HPLC usando uma solução de onco A a 4 µg.mL⁻¹. Os efeitos variáveis estimados foram então determinados calculando a razão das concentrações observadas e teóricas de onco A. Os efeitos das variáveis estudadas foram avaliados graficamente e estatisticamente usando o software Statistics (Versão 7.0, StatSoft, EUA) para validar o delineamento experimental. Gráficos de superfície de resposta foram gerados para visualizar os efeitos simultâneos de cada variável em cada parâmetro de resposta.

4.2.3 Aplicabilidade do Método Validado

4.2.3.1 Determinação da Solubilidade da Oncocalixona A

A solubilidade da onco A foi pela técnica de saturação por agitação do frasco conforme o método descrito por Higuchi e Connors, 1965, adaptada por Xavier-Júnior *et al.* (2016). Resumidamente, um excesso da onco A foi adicionada em um frasco de vidro contendo, separadamente, 1 mL de água deionizada, tampão fosfato pH = 2,8 (pH gástrico), pH = 6,8 (pH intestinal), tampão borato (pH = 5,5), tampão borato (pH = 7,0), tampão borato (pH = 9,0), óleo de soja, óleo de copaíba e TCM. Em seguida, todos os frascos foram selados, protegidos da luz e agitados sob agitação magnética a 300 rpm (Mag Mixer, M-41, Yamato Scientific CO, Tóquio, Japão) durante 24 h a 25 ± 1 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8.792 g por 15 min (centrífuga Kubota KR-20000T, rotor RA-1M, Tóquio, Japão). O sobrenadante foi filtrado em filtro de membrana de 0,22 µm (Millex®, Millipore, EUA), diluído na fase móvel e mantido em banho de ultrassom (Unique USC-750, Indaiatuba, Brasil) por 15 minutos. A concentração de onco A em cada um dos diferentes meios foi analisada usando CLAE como descrito anteriormente. A Figura 17 apresenta um diagrama com a metodologia de preparação das amostras para avaliação da solubilidade utilizando o método de CLAE previamente validado.

Figura 17 - Esquema do preparo das amostras para o estudo de solubilidade.

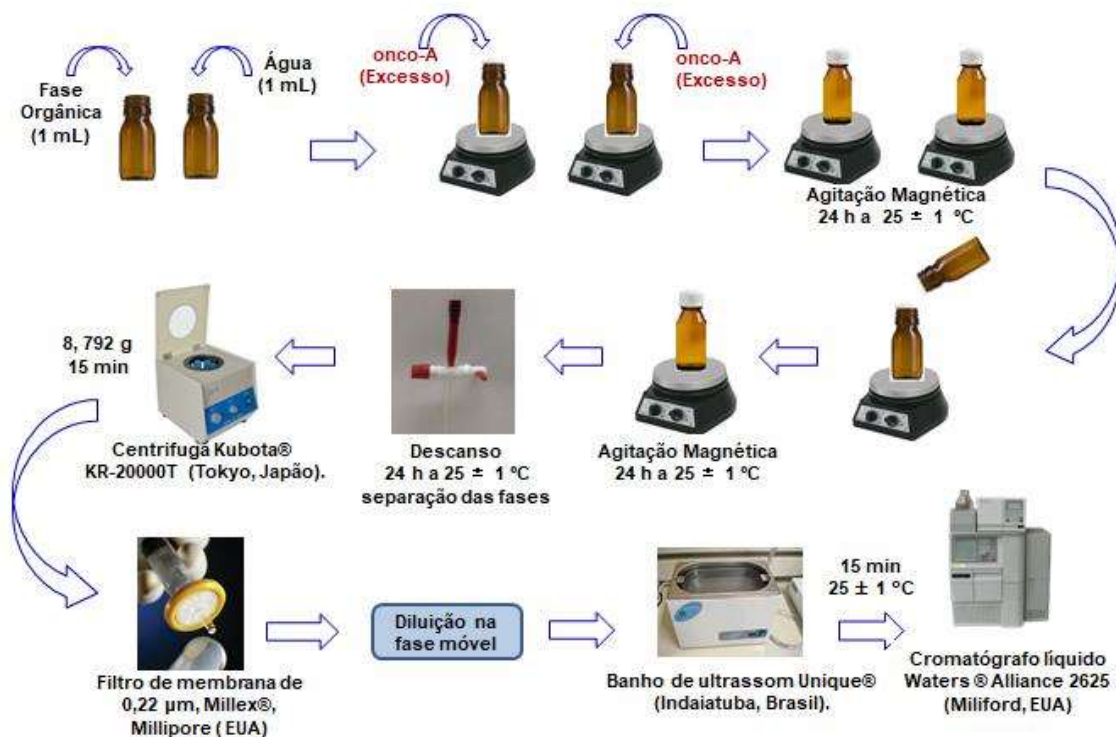


Solvente equivale a água deionizada, fluidos gástrico e intestinal farmacopeicos, tampão borato (pH=5,5; 7;9), óleos de soja, copaíba e triglicerídeos de cadeias média, separadamente. Fonte autor próprio.

4.2.3.2 Determinação do Coeficiente de Partição da Oncocalixona A

O coeficiente de partição de onco A entre n-octanol /água, TCM/água, óleo de resina de copaíba/água e óleo de soja/água foi determinado pelo método tradicional de agitação no frasco a 25 °C (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2016). Resumidamente, octanol, óleo (soja, copaíba e MCT) e água desionizada (1 mL) foram colocados separadamente em frascos ambar com rolha de vidro. Um excesso de onco A foi então adicionado em cada fase e mantido sob agitação mecânica durante 24 horas a 25 ± 1 °C. Em seguida, a fase oleosa e a fase aquosa foram misturadas e mantidas sob agitação mecânica (Mag Mixer, M-41, Yamato Scientific CO, Tóquio, Japão) por 24 horas a 25 ± 1 °C. As amostras foram então centrifugadas a 8.792 g por 15 min (centrífuga Kubota KR-20000T, rotor RA-1M, Tóquio, Japão) e as fases oleosa e aquosa foram cuidadosamente separados, diluídos conforme necessário com a fase móvel, e submetidos à banho de ultrassom (Unique USC-750, Indaiatuba, Brasil) por 15 minutos. Em seguida, as soluções resultantes foram analisadas pelo método de CLAE como descrito anteriormente. O coeficiente de partição ($\log P$) foi tomado como o logaritmo da razão entre as concentrações do fármaco medidas nas fases lipofílica e aquosa.

Figura 18 - Esquema de preparo das amostras para o estudo do coeficiente de partição.

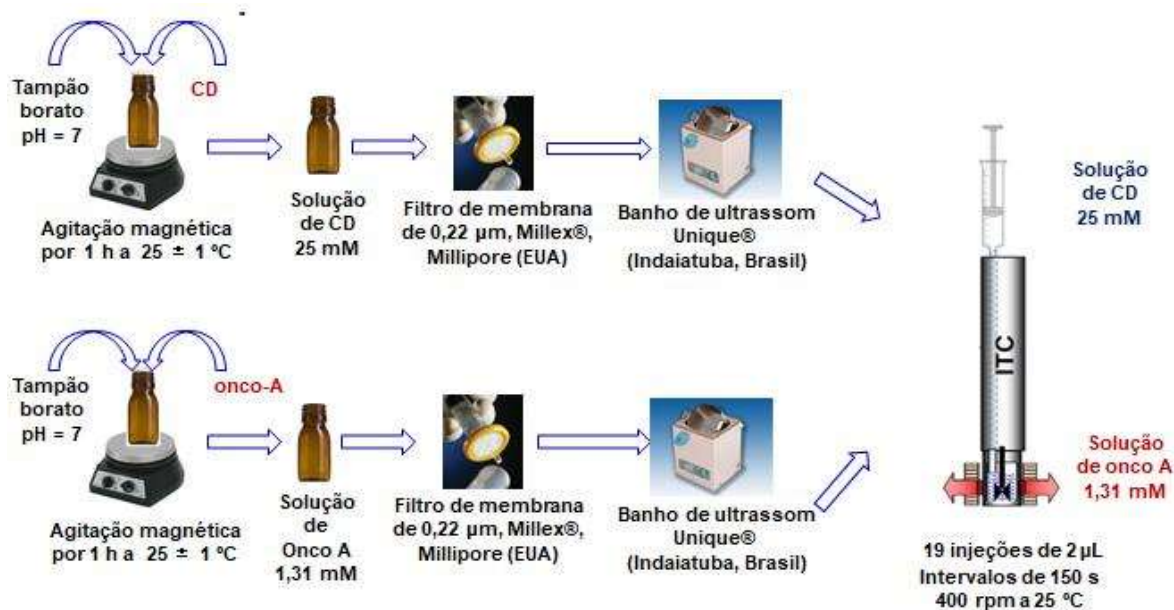


Fonte: autor próprio.

4.2.4 Avaliação da Interação da Onco A com CDs por Calorimetria de Titulação Isotérmica

A energia da ligação da onco A com CDs (β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD, γ -CD e HP- γ -CD) foi determinada usando um calorímetro de titulação isotérmica (ITC-200 MicroCal, GE, Northampton, EUA). Uma solução de onco A (1,31 mM) foi preparada em tampão de borato 0,05 M a pH = 7,0 sob agitação magnética a 300 rpm durante 24 h a 25 °C. A solução foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,22 μ m (Millex®, Millipore, EUA) e desgaseificada com banho de ultrassom (Unique USC-750, Indaiatuba, Brasil) por 30 minutos (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2017). Conforme esquematizado na Figura 19, todas as soluções titulantes de CDs (25 mM), com exceção de β -CD, cuja solubilidade máxima nessas condições é de 15 mM, foram preparadas em tampão borato 0,05 M (pH = 7,0), filtradas através de um filtro de membrana de 0,22 μ m e desgaseificadas. Para os experimentos de ITC, a célula de amostra foi preenchida com 200 μ L de solução onco A (1,31 mM) e titulada com 40 μ L de solução de CD colocada na seringa sob agitação de 400 rpm a 25 °C. A primeira injeção de 0,4 μ L foi descartada para eliminar os efeitos de difusão do material da seringa na célula da amostra.

Figura 19 - Esquema dos ensaios de avaliação das interações moleculares por ITC.



Fonte: autor próprio.

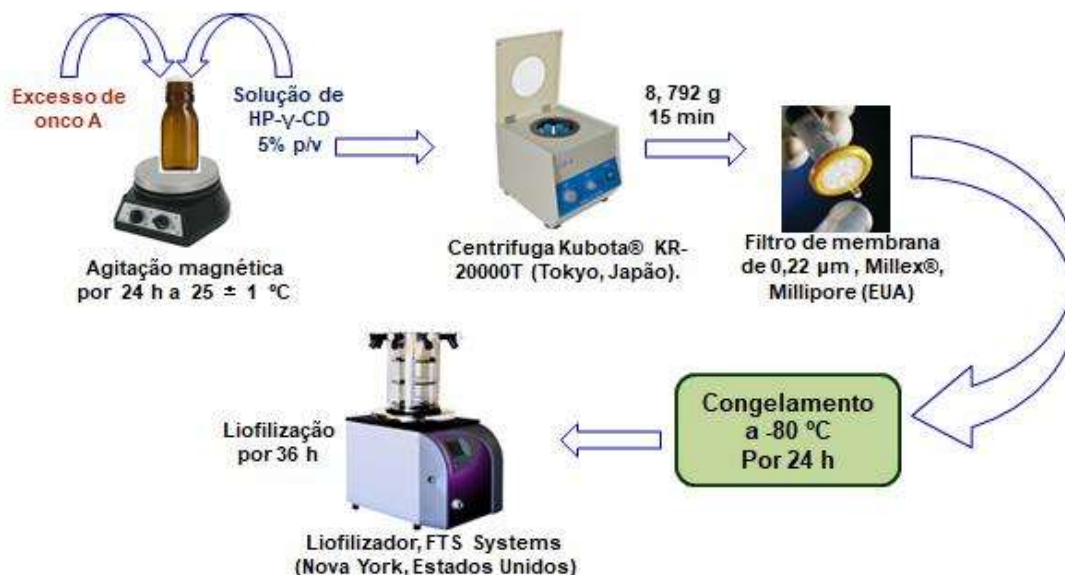
Os experimentos foram conduzidos com 19 injeções consecutivas 2 μ L da amostra de CD com uma duração de 5 segundos cada, com intervalos de 150 segundos, a uma velocidade de agitação de 400 rpm e temperatura fixa de 25 °C. Para dedução dos efeitos dos aquecimentos de diluição da interação hóspede-hospedeiro, também foram realizadas de titulação para soluções de CDs preparadas em solução tampão de borato 0,05 M (pH = 7,0) puro, colocado na célula de amostra. Os dados consistiram em uma série de fluxos de calor em função do tempo, que foram coletados automaticamente e analisados pelo software Origin 7, associado ao equipamento. O fluxo de energia foi registrado e as interações fornecem ΔH e ΔG e o cálculo utilizando esses parâmetros, fornecem os valores de ΔS . Adicionalmente, a estequiometria (n) e constante de ligação (K), foram então ajustadas.

4.2.5 Preparo do Complexo de Inclusão Onco A:HP- γ -CD

Após a determinação dos parâmetros termodinâmicos (entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG) da interação entre onco A e CDs, e a constante de afinidade (N) e estequiométrica (K), no estudo de ITC, preparou-se o complexo de inclusão mais energeticamente favorável. Dessa forma, o complexo de onco A:HP- γ -CD foi preparado pela adição de um excesso de onco A num frasco de vidro ambar contendo 5 ml de solução de HP- γ -CD a 5% (p/v) em água deionizada. O sistema ficou sob agitação magnética a 300 rpm por 24 h a 25 ± 1 °C e depois foi centrifugado a 8,792 g por 15 min. O sobrenadante foi então filtrado, utilizando um filtro de membrana de 0,22 μ m (Millex®, Millipore, USA). A amostra foi congelada a -80 °C por 24 h e logo após liofilizada (FTSsystems Model EZ-Dry, Nova York, EUA) por 36 h. A Figura 20 esquematiza o preparo do complexo de Inclusão Onco A:HP- γ -CD.

A mistura física da onco A e HP- γ -CD foi utilizada como controle foi preparada misturando o pó de ambos os componentes numa relação molar de 1:1. A mistura física, utilizada geralmente como padrão de não complexação, é obtida simplesmente com a junção da ciclodextrina com a molécula a ser complexada. Contudo a literatura relata descreve que mesmo na mistura física é possível a formação de interações entre a ciclodextrina e a droga (BARBATO *et al.*, 2003).

Figura 20 - Esquema de obtenção do complexo de inclusão onco A:HP- γ -CD.



Fonte: autor próprio.

4.2.6 Caracterização do Complexo de Inclusão Onco A:HP- γ -CD

4.2.6.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) da onco A, HP- γ -CD, complexo onco A:HP- γ -CD e mistura física foram registrados em um espectrômetro Vertex 70 (Bruker Optics, Ontario, Canadá) equipado com um detector DTGS, uma fonte e um divisor de feixe de amplo alcance, usando um acessório de refletância total atenuada (ATR) de diamante de reflexão única (Platinum, Bruker Ótica, Ontário, Canadá).

Os espectros de FTIR foram obtidos em uma resolução de 2 cm^{-1} na região de $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$. As pastilhas de KBr foram preparados a partir de misturas de KBr e a amostra em Proporção de 200:1 usando uma prensa hidráulica. O software OPUS multitarefa foi usado para correções de linha de base e análise de dados.

4.2.6.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os deslocamentos químicos de ^1H RMN (δ) da Onco A, HP- γ -CD e do complexo de inclusão onco A: HP- γ -CD foram realizados usando um espectrômetro de RMN de 400 MHz (Varian, Santa Clara, EUA) operando a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram dissolvidas em D_2O em um

tubo de 5 mm por 3 h a 25 °C. O 3-(trimetilsilil) propionato de sódio- d_4 foi usado como referência. Cada espectro obtido a partir de 64 varreduras com uma largura espectral de 6410,3 Hz, tempo de aquisição de 2,556 s e um atraso de 2 s por varrimento. O ângulo de pulso foi de 90°.

4.2.6.3 Análise Térmica

Calorimetria de varredura diferencial (DSC) e termogramas termogravimétricos (TG) da onco A, HP- γ -CD e dos complexos de inclusão Onco A:HP- γ -CD foram obtidos utilizando-se Equipamento DCS/TG (Jupiter STA 449, Netzsch, Alemanha). Amostras de 5 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio selados com tampas perfuradas. As medições foram registadas desde 25 °C até 400 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os sensores e cadinhos foram submetidos a um fluxo constante de nitrogênio (70 mL.min⁻¹) durante os experimentos.

4.2.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O aspecto microscópico da onco A, HP- γ -CD e do complexo de inclusão Onco A:HP- γ -CD e mistura física foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (SEM, FEI, Quanta 200 FEG, Hillsboro, EUA). As amostras liofilizadas foram fixadas em abas de carbono (fita dupla adesiva revestida de carbono) aderidas astubs de alumínio e depois foram revestidas com uma camada fina (30 Å) de ouro, empregando revestidor por aspersão Polaron-E 3000. Subsequentemente, as amostras foram examinadas usando MEV a uma voltagem de aceleração de 10 kV sob baixo vácuo. As imagens foram captadas com ampliação de 2040X.

4.2.7 Preparo dos Sistemas de Liberação de Fármacos contendo a Onco A

4.2.7.1 Microesferas de PLGA

As microesferas de PLGA foram preparadas de acordo com a metodologia de Ribeiro-Costa *et al.* (2004). Primeiramente, PLGA (225 mg) e onco A (10 mg) foram solubilizados, separadamente, em diclorometano (2 mL) e emulsificado com 2 mL de solução aquosa de PEG 4000 (200 mg) usando um homogeneizador Ultra-Turrax (T25, IKA, Germany) a 8000

rpm por 60 segundos usando banho de gelo, resultando assim na emulsão primária (A/O). Essa emulsão resultante foi adicionada a uma fase contínua consistindo de 45 mL de uma solução aquosa de PVA a 5% (p/v) e emulsificada a 8000 rpm por 30 segundos, usando banho de gelo, resultando assim na emulsão secundária (A/O/A). Essa emulsão foi então agitada por uma hélice de quatro pás (Mechanic Stirrer RE 162/P, IKA, Germany) a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 400 rpm por 4 h até completa evaporação do solvente e formação das microesferas. Na sequência, a preparação o sistema foi centrifugada (KUBOTA, NK-70, Centrifuge, Japan) a 3000 rpm por 5 min e posteriormente lavadas por três vezes com água deionizada.

4.2.7.2 Microaprtículas de Alginato

Foram preparadas microesferas de alginato por gelificação ionotrópica, segundo adaptações da metodologia descrita previamente Wittaya-Areekul *et al.* (2006) e Mennini *et al.* (2012). Preparou-se uma solução de alginato de sódio a 2% (p/v) em solução aquosa a 1% (p/v) de Tween, na qual foi solubilizada 5mg de onco A. Para a formação das microesferas, foram aspergidos 10 mL da solução de alginato contendo a onco A na solução de cloreto de cálcio (3%) usando Micoencapsulador B395 Pro (Buchi Labortechnik AG, Falwil, Switzerland) com bico de 150 μm . Utilizaram-se os seguintes parâmetros: frequência de 1200 Hz, eletrodo de 550 V, fluxo de 12 mL/min, e agitação magnética de 100%.

4.2.7.3 Nanoesferas de PCL

Foram preparadas nanoesferas de PCL revestidas de quitosana (0,5%), baseadas no método descrito por Mazzarino *et al.* (2014). Pesou-se 24 mg de quitosana e adicionou-se 10 mL de água acidificada com ácido acético 1% (v/v) sob agitação até completa solubilização da quitosana. Em seguida, preparou-se uma solução de adicionou-se 62,5 mg de polaxamer-188, em água acidificada 1% sob agitação constante. Na sequência, verteu-se a solução de polaxamer na solução de quitosana e completou-se o volume para 24 mL, obtendo-se assim a fase aquosa. Paralelamente, 60 mg de PCL e 5 mg de onco-A foram solubilizados em 12 mL de acetona, sob agitação constante. Em seguida, verteu-se a fase orgânica na fase aquosa e deixou-se em agitação por 15 min. A dispersão coloidal foi então evaporada a baixa pressão, até obter 10 mL de formulação.

4.2.7.4 Nanocápsulas de PCL Revestidas com Quitosana

Foram preparadas nanocápsulas de PCL revestidas de quitosana (0,5 %), baseadas na técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989) com adaptação descrita por Bender *et al.* (2012) e Ce *et al.* (2016). Primeiramente, uma fase orgânica contendo PCL (100 mg), onco A (10 mg), monoestearato de sorbitano (40 mg) e triglicérideo de ácidos caprílico/cáprico (120 mg) foram dissolvidos em acetona (30 mL) a 40 °C. Em paralelo, preparou-se uma solução etanólica (4 mL) de fosfatidilcolina de soja (60 mg) e verteu-se na solução de acetona, obtendo-se assim a fase orgânica (I).

A fase orgânica (I) foi injetada numa solução aquosa de polissorbato 80 (80 mg) (II) utilizando um funil, a 40 °C. Uma solução turva branca (III) foi formada instantaneamente, a qual foi mantida sob agitação magnética durante 10 min a 40 °C. Na sequência, a dispersão coloidal obtida foi submetida à evaporação a baixo vácuo a 40 °C para remoção dos solventes orgânicos (acetona e etanol) e diminuição do volume de água até 9 mL, quando deseja-se obter as nanocápsulas revestidas de quitosana (oncoA-NCQT) e até 10 mL para as nanocápsulas não revestidas (onco A-NC) (BENDER *et al.*, 2012; CE *et al.*, 2016).

As nanocápsulas podem ter sua superfície modificada quimicamente por em ligações eletrostáticas do polímero com a quitosana (JAGER *et al.*, 2009; BENDER *et al.*, 2012). Dessa forma, a reação interfacial de oncoA-NCQT (9 mL) com quitosana foi realizada por adição de 1 mL de quitosana a 0,5% (m/v), preparada em solução aquosa de ácido acético (1% v/v). O sistema permaneceu sob agitação magnética durante 4 h à 25 °C (BENDER *et al.*, 2012; CE *et al.*, 2016). As formulações sem fármaco foram obtidas tal como descrito acima utilizando as mesmas composições, sem a onco A no processo. Assim como as nanocápsulas não revestidas (onco A-NC) não passaram para etapa de incubação na solução de quitosana.

O tamanho médio e carga superficial das nanocápsulas foram determinados utilizando-se a técnica de detecção da intensidade de espalhamento de luz em ângulo de 90° e mobilidade eletroforética, respectivamente, em um analisador de partículas (ZetaSizer Nano-ZS90, Malvern, Worcestershire, UK). Uma alíquota de 20 µL de dispersão aquosa da nanopartículas foi diluída utilizando 980 µL de água ultra pura Mili-Q® e solução de cloreto de sódio a 1 mM, para determinação do tamanho de partícula e carga de superfície, respectivamente. Em cada leitura foi obtido o diâmetro médio e potencial zeta das partículas (PZ). Os resultados obtidos correspondem a leituras em triplicata de três amostras distintas.

4.2.8 Determinação da Eficiência de Encapsulação da Onco A em Nanocápsulas

A extração da onco-A foi realizada adicionando-se uma alíquota de 50 µL de formulação (oncoA-NC ou oncoA-NCQT) e completou-se volume final de 1000 µL com acetonitrila. Após 30 min de sonicação a solução foi centrifugada a 15000 rpm a 4°C (Kubota KR-20000 T, Rotor RA-1 M, Toquio, Japão). O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de membrana de 0,22 µm (Millex, Millipore, França) e depois 100 µL do sobrenadante foi retirado e adicionado em 900 µL de fase móvel e injetado em CLAE (Alliance 2625, Waters, Miliford, EUA), o comprimento de onda de detecção foi ajustado em 283 nm.

A eficiência de encapsulação (%EE) foi determinada após ultracentrifugação-ultrafiltração das amostras. Alíquotas de 500 µL das formulações foram separadamente inseridas em unidades ultrafree (Millex®, Millipore, USA) e após centrifugação por 15 min a 10000 rpm a 4 °C, retirou-se 20 µL do filtrado e adicionou-se em 980 µL de fase móvel. A solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm em seguida injetada para quantificação de onco-A no HPLC a 283 nm. Todas as quantificações foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação da onco A foi calculada usando a Equação 11:

$$EE\% = \frac{[Teor\ de\ Onco\ A - Teor\ de\ Onco\ A\ no\ filtrado]}{[Teor\ de\ Onco\ A]} \quad (11)$$

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ D.P. As médias de dois grupos foram comparadas usando o teste T de Student não pareado. A análise de variância one-way (ANOVA) com o procedimento de comparação múltipla de Tukey também foi aplicada aos dados, considerando significância em $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-UV

O desenvolvimento e a validação de um método CLAE-UV para a quantificação de onco A foram realizados e aplicados para determinar sua solubilidade, coeficiente de partição e conteúdo em nanocápsulas (NC) carreadoras de onco A. Levando em conta as atividades farmacológicas da onco A, tais como antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2003; BOYE *et al.*, 2013), citotóxica frente a linhagens cancerosas (LEVYA *et al.*, 2000; PESSOA *et al.*, 2004); antibacteriana (LLAYAJARA *et al.*, 2014); inibidora de agregação plaquetária (FERREIRA *et al.*, 2008); hipoglicemiante (SIVAGNANAN; KALAIVANANAN; RAJAMANICKAM, 2013); antitumoral (BARRETO *et al.*, 2013); Leishmanicida (VIANA *et al.*, 2015), analgésica e anti-inflamatória (FERREIRA *et al.*, 2004; LLAYAJARA *et al.*, 2014) e seu uso potencial para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, surgiu a necessidade de desenvolver um método robusto para quantificar esta molécula na presença de compostos interferentes.

Um estudo conduzido por pesquisadores da UFC (COSTA *et al.*, 2004), desenvolveu e validou um método de CLAE para identificar e quantificar de quinonas, entre elas a onco-A em extrato etanólico de *Auxemma glazioviana*, porém esse método não foi seletivo para a onco A, ademais, apenas os parâmetros de validação linearidade, exatidão e precisão foram determinados nesse estudo.

Assim, o presente trabalho de tese, consistiu no desenvolvimento e uma validação completa de um método de CLAE para obter uma análise de rotina do onco A uma matriz farmacêutica complexa. A Tabela 3 apresenta as condições cromatográficas utilizadas no método analítico de quantificação da onco A em CLAE-UV. As condições cromatográficas selecionadas foram adequadas para a separação da onco A dos possíveis interferentes oriundos dos respectivos maíais analisados.

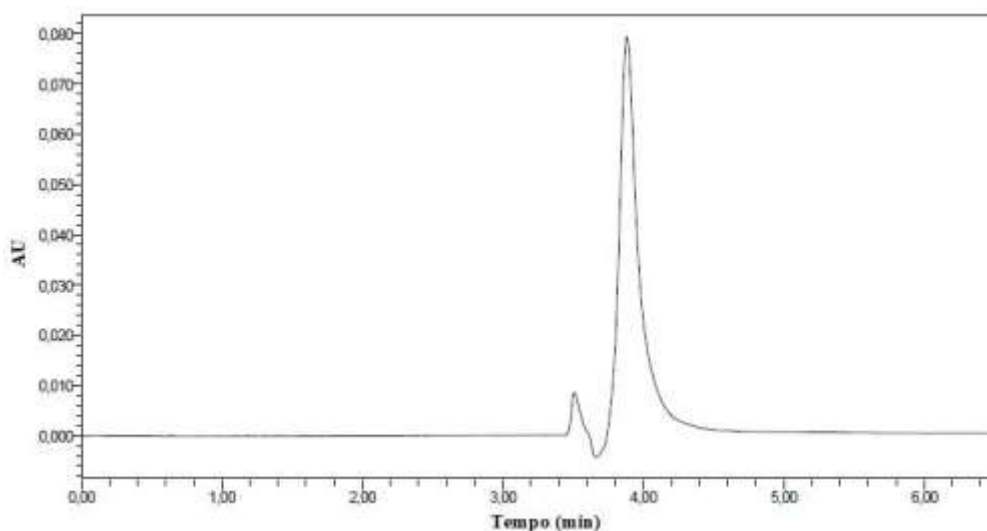
Tabela 3 - Condições cromatográficas do método de quantificação da onco A por CLAE acoplado a detector UV.

Parâmetro	Configuração
Coluna	C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm, X Bridge® Waters)
Fase móvel	Água/ Acetonitrila (70: 30, v/v)
Fluxo	0,7 mL/min
Tempo de análise	10 min
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	200-400 cm ⁻¹
Pico de absorção	283 nm

Fonte: autor próprio.

A proporção de fase móvel utilizada apresentou equilíbrio entre os solventes apolar (acetonitrila) e polar (água acidificada) (30:70) e o método foi executado em temperatura ambiente (25 °C) sem a necessidade de submeter a coluna a alta temperatura, que diminui a vida útil da mesma. O fluxo de fase móvel em 0,7 mL/min proporcionou um tempo de análise de 10 minutos, com o pico da Onco A apresentando tempo de retenção (T_r) de $4,341 \pm 0,003$ min. A Figura 21 apresenta o cromatograma típico da eluição da onco A, de acordo com as condições cromatográficas com o pico referente à onco A, na faixa de 0,99 a 1,0 de pureza.

Figura 21 - Cromatograma típico da eluição da onco A.

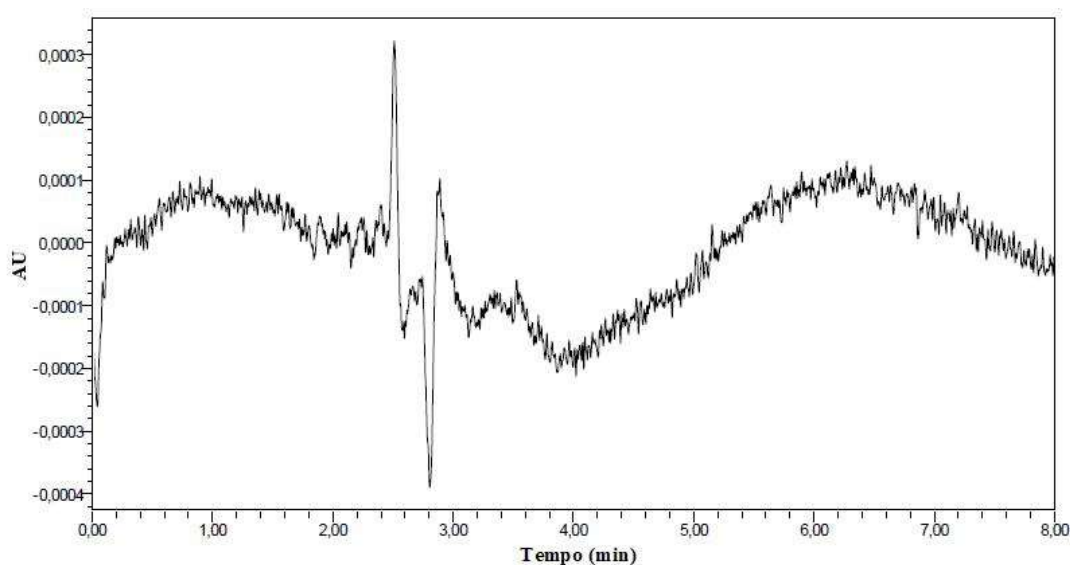


Fonte: autor próprio.

6.1.1 Seletividade

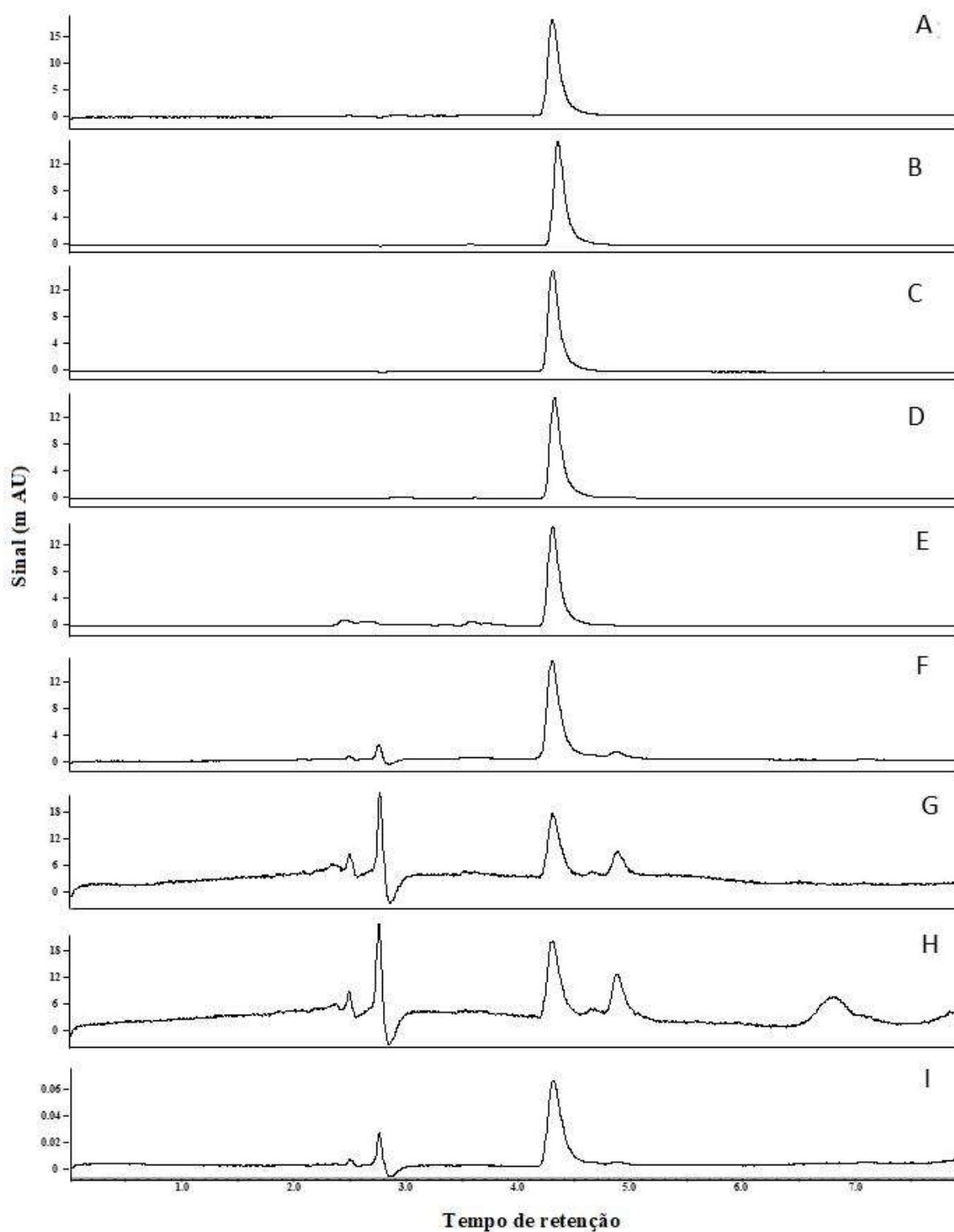
A seletividade do método analítico utilizando cromatografia de fase reversa, com eluição isocrática, foi confirmada pela análise de soluções de onco A a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em soluções tampão de borato (pH = 5,5, 7 e 9), fluidos gástrico e intestinal simulados, respectivamente e fases oleosas: octanol, copaíba, soja e TCM. Na Figura 22 observa-se o cromatograma da fase móvel enquanto na Figura 23 observa-se os cromatogramas com separação do pico da onco A de outros picos atribuídos aos compostos na matriz solvente analítica. Os picos de pureza dos cromatogramas sugerem seletividade do método para onco A com picos bem separados sem picos de interferentes da amostra.

Figura 22 - Cromatograma representativo da fase móvel.



Fonte: autor próprio.

Figura 23 - Cromatogramas representativos de onco A a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes meios.

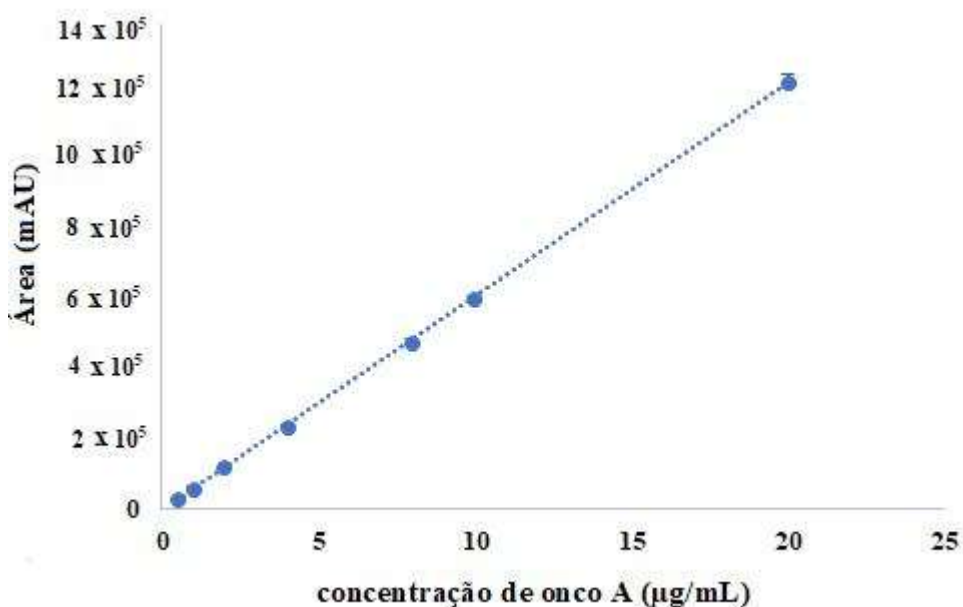


Cromatogramas representativos de onco A a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes meios: onco A na fase móvel (A); água deionizada (B), solução tampão de borato pH = 7 (C); fluido gástrico simulado pH = 2,8 (D); fluido intestinal simulado pH = 6,8 (E); triglicerídeos de cadeia média (F); óleo de resina de copaíba (G); óleo de soja (H); octanol (I). Fonte: autor próprio.

6.1.2 Linearidade

A regressão linear ajustada para a curva padrão da onco A ($0,5$ a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 24) foi $[\text{onco A}] = (\text{Abs} + 4576,1)/61775$ ($r = 0,9999$), onde $[\text{onco A}]$ é a concentração de onco A ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e Abs é a área do pico ($\mu\text{V.s}$). A inclinação da curva padrão linear foi estatisticamente diferente de 0 (61038-62512).

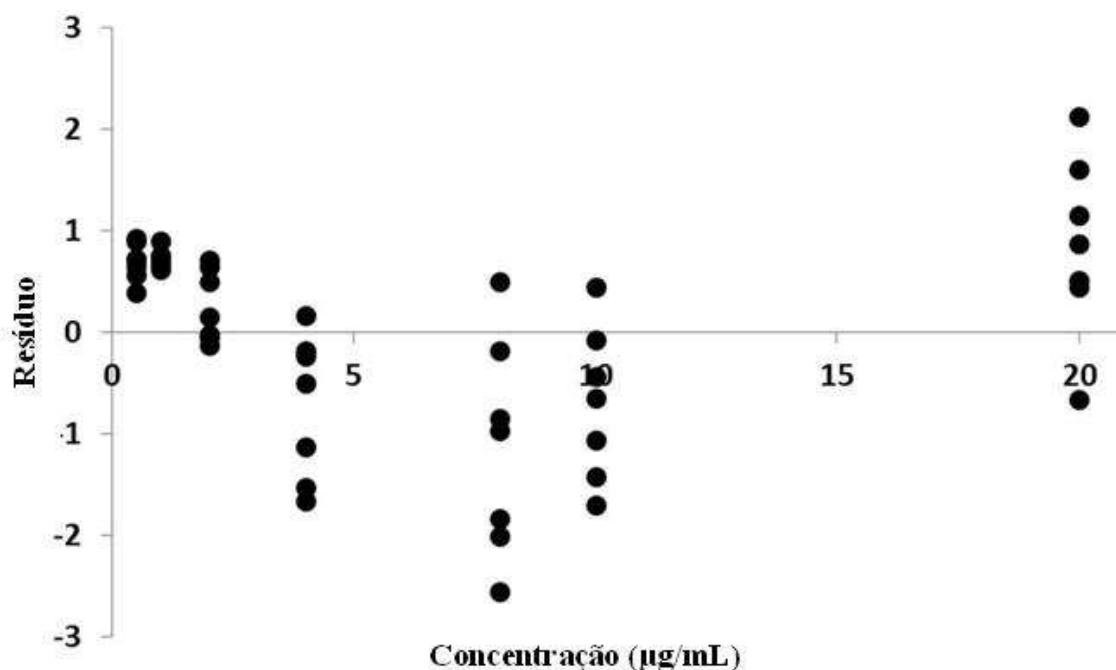
Figura 24 - Curva de calibração da onco A.



Fonte: autor próprio.

Além disso, o método desenvolvido mostrou homocedasticidade dos resíduos pelo teste complementar de Wilcoxon, no qual as variâncias são as mesmas que a distribuição normal dos valores encontrados no modelo de regressão linear (Figura 25). Por análise de ANOVA, foi realizado o teste de significância para regressão linear (ICH, 2005; FDA, 2015), a fim de determinar se o modelo de regressão era adequado para gerar uma relação linear entre a variável resposta de absorbância e algumas das variáveis de concentração de onco-A. Além disso, como $F_{\text{calculado}} = 46412,81 > F_{\text{tabulado}} = 6,61$ em $\alpha = 0,05$ para a média de três medidas da curva padrão, o modelo proposto foi considerado adequado para descrever a regressão linear na faixa de concentrações onco de $0,5$ a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 25 - Distribuição dos resíduos obtidos a partir de sete curvas padrão independentes com concentrações variando de 0,5 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.



Fonte: autor próprio.

6.1.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LQ e o LD para a precisão e precisão para este método foram de 0,41 e 0,14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Usando um cenário experimental, o LQ na escala de nanogramas é capaz de garantir uma boa quantificação do onco A em formas de dosagem farmacêuticas baseadas em uma matriz oleosa sintética ou complexa.

6.1.4 Efeito Residual

O efeito residual foi detectado pela injeção de amostra em branco após a injeção da maior concentração da curva padrão onco A (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O *carry-over* é o principal problema envolvido na diminuição da exatidão e precisão nas análises cromatográficas líquidas, uma vez que é impulsionado pelas propriedades químicas do analito, tais como lipofilicidade/hidrofiliicidade e/ou a concentração da amostra que elui após as análises, afetando potencialmente a análise subsequente (MOEIN; BEQQALI ABDEL-REHIM, 2017).

Neste estudo, não foi detectado efeito residual para a fase móvel em branco após a injeção da concentração máxima de onco A ($p < 0,05$). Este resultado foi de acordo com as

recomendações das diretrizes regulatórias, nas quais a resposta da eluição da fase móvel após o analito deve ser inferior a 20% da resposta máxima do LQ.

6.1.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados do teste com o valor verdadeiro. A precisão do método de CLAE foi determinada levando-se em consideração três níveis de concentrações de onco-A (0, 5, 4 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 4). A exatidão variou de 98,04 a 104,07% e o DPR foi menor que 2,53%. Esses valores estão na faixa de 95 a 105% recomendada pelo FDA. No geral, o método validado apresentou exatidão, satisfazendo os requisitos de pesquisa de qualidade de fármacos.

Tabela 4 - Exatidão do método de CLAE-UV para quantificação da onco A.

Conc. Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Obtida ($\mu\text{g/mL}$)	DP	Exatidão (%)	DPR (%)
0,5	0,52	0,01	104,07	1,64
4,0	3,92	0,08	98,04	2,03
20,0	20,1	0,51	100,48	2,53

DP: Desvio Padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo. Fonte: autor próprio.

6.1.6 Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária em dias diferentes (ensaio inter-dia) por dois analistas usando três diferentes concentrações de onco-A (0, 5, 4 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os resultados são apresentados na Tabela 5. As DPR de repetibilidade ($n = 3$) e inter-dia foram inferiores ou iguais a 2,21 e 3,12%, respectivamente, o que indica que o método apresentou baixo número de erros aleatórios. Em outras palavras, nenhuma mudança significativa entre as análises é encontrada usando este método.

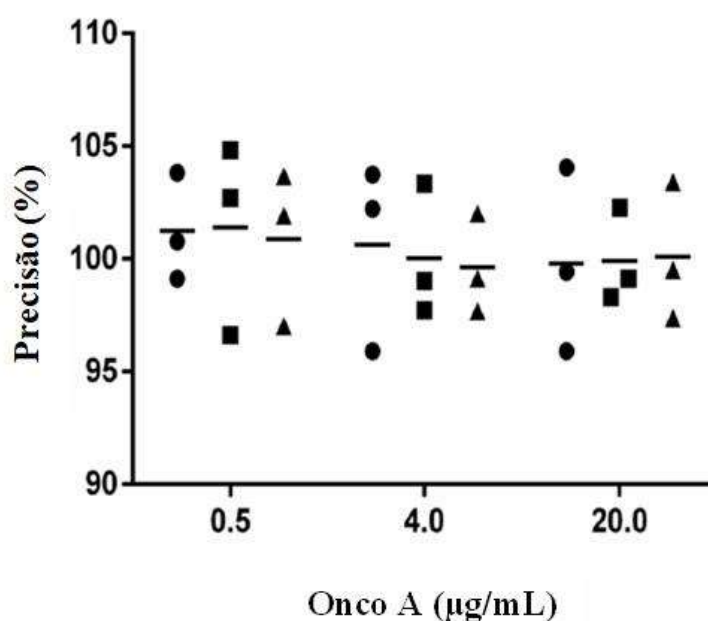
Tabela 5 - Análise da Precisão Intra-dia e Inter-dia do método de CLAE-UV para quantificação da onco A.

Parâmetros	Conc. Observada ($\mu\text{g/mL}$)	DP	Precisão (%)	DPR (%)
Precisão Intra-dia	0,5	0,57	0,003	0,47
	4,0	4,02	0,039	0,97
	20,0	19,96	0,041	2,21
Precisão Inter-dia	0,5	0,55	0,017	3,12
	4,0	3,97	0,074	1,85
	20,0	19,85	0,383	1,93

DP: Desvio Padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo. Fonte: autor próprio.

O método proposto também foi bastante resistente aos erros do analista, com valores de coeficiente de variação inferiores a 3,25%, o que está de acordo com as exigências das agências reguladoras no ensaio de matérias-primas e formas farmacêuticas (Figura 25). Com base nesses resultados, a repetibilidade e as precisões intermediárias do método foram, portanto, consideradas satisfatórias, apresentando baixos erros aleatórios ($p < 0,05$).

Figura 26 - Precisão intermediária do método de CLAE para a quantificação de onco A.



Fonte: autor próprio.

6.1.7 Robustez

A robustez mede a capacidade de um método analítico de não ser afetado por variações pequenas, mas deliberadas, fornecendo uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal (SAHU *et al.*, 2018). Neste estudo, todas as condições robustas (taxa de fluxo, temperatura da coluna e composição da fase móvel) foram ligeiramente variadas em 5%, de acordo com o desenho experimental. A abordagem Box-Behnken utilizada neste trabalho representou uma metodologia fácil ao fornecer dados importantes sobre a pequena variação no método de quantificação do onco A, limitando o número de experimentos a serem realizados e, conseqüentemente, a quantidade de reagente e tempo. A área e o tempo de retenção foram selecionados para analisar a pequena variação na quantificação de onco A, enfatizando sua importância como parâmetros críticos para essa finalidade.

Neste estudo, a concentração adicionada de onco A foi de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$; no entanto, a concentração encontrada em condições robustas variou de 3,92 a $4,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim, não foi identificado desvio padrão relativo significativo entre os três fatores independentes (taxa de fluxo, temperatura da coluna e fase móvel) influenciando a concentração de onco. A análise de variância foi utilizada para testar a significância das variáveis independentes e suas interações, assegurando a robustez do método, que suporta bem pequenas variações nas condições analíticas estabelecidas, sem comprometer a confiabilidade dos resultados (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

O coeficiente de determinação (R^2) forneceu uma medida de quanto variabilidade nos valores de resposta observados poderia ser explicado pelas variáveis experimentais e suas interações (CHENG; SHALABH; GARG, 2014). A matriz dos experimentos (Tabela 6) apresenta os fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial. Além disso, a matriz foi considerada estatisticamente significativa com uma relação linear de $R^2 = 0,986$, o que indica que o modelo pode responder por 98,6% da variabilidade na variável resposta. Além disso, o valor do coeficiente de determinação ajustado ($\text{Adj } R^2 = 0,959$) também foi importante para confirmar a alta significância do modelo, um valor muito próximo ao R^2 experimental, implicando uma boa qualidade de ajuste entre os modelos e os dados experimentais (XU; JIANG; QIU, 2018).

Tabela 6 - Fatores e níveis do planejamento experimental.

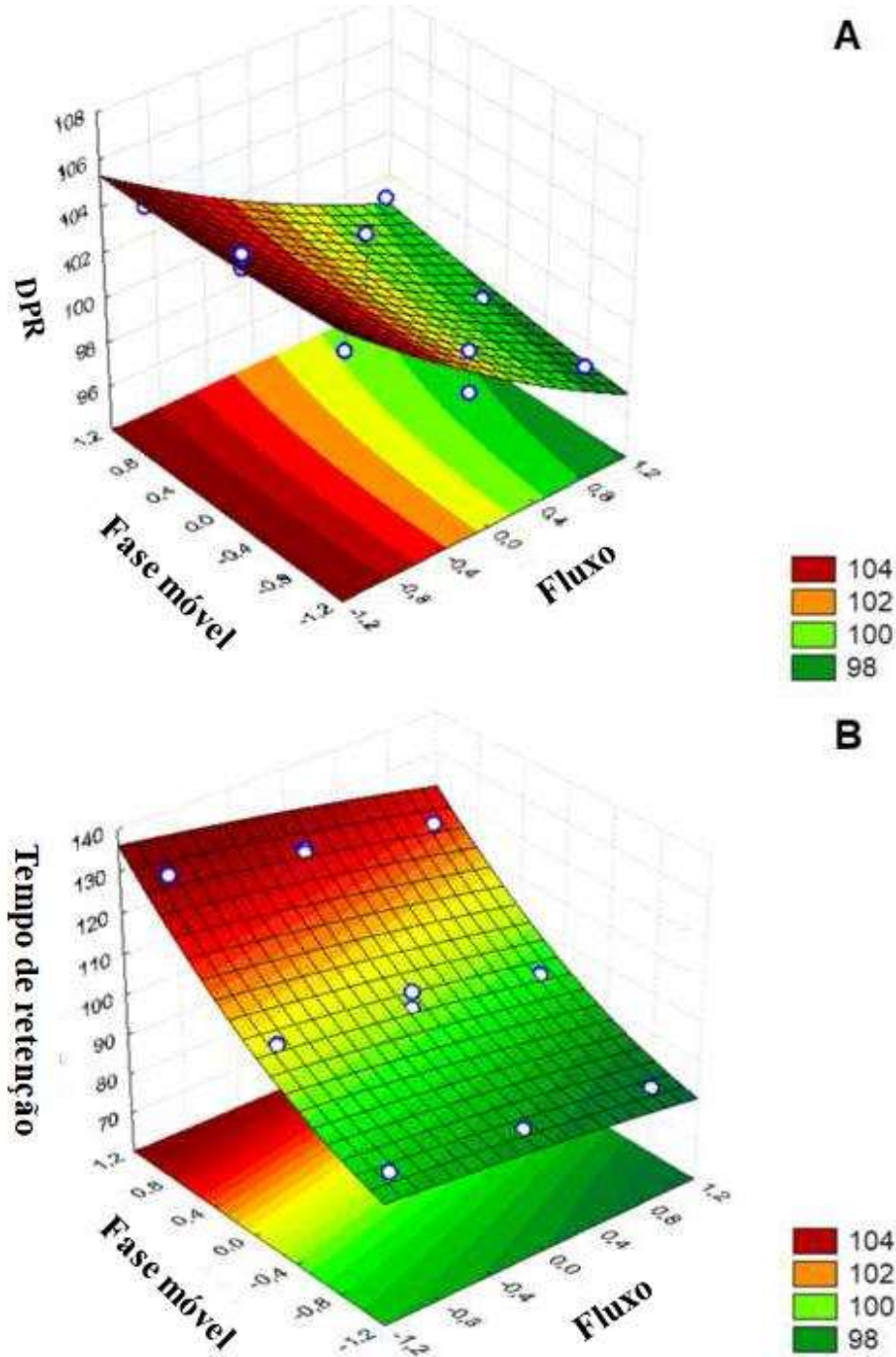
Fator	Unidade	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Fluxo	0,7 mL/min	0,665	0,7	0,735
Temperatura	°C	23,7	25	26,8
Composição de fase móvel	mL/mL	66,5/33,5	70:30	73,5/26,5

Fonte: autor próprio.

Com o objetivo de realizar um exame direto das variáveis experimentais nas respostas, foram extraídas as superfícies de resposta tridimensionais. Uma superfície de resposta de área de pico calculada tridimensional, relacionando a fase móvel e a taxa de fluxo ao desvio padrão relativo de onco A, é mostrada na Figura 27A. As pequenas variações desses parâmetros exibiram um desvio padrão relativo variando de 2 a 3%, indicando que não há mudanças significativas nas áreas de pico dos cromatogramas atribuídos ao onco A.

Esses resultados estão de acordo com os requisitos das agências reguladoras, mas sem interferência dos picos em todas as condições robustas. Em relação ao tempo de retenção, o modelo proposto apresentou alta capacidade preditiva ($R^2 = 0,996$, $p < 0,05$). Além disso, a superfície de resposta de primeira ordem completa foi plotada para análise do desvio padrão residual do tempo de retenção (Figura 27B).

Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta tridimensional do desvio padrão relativo das respostas de área de pico (A) e tempo de retenção (B), com fase móvel e taxa de fluxo como variáveis independentes.



Fonte: autor próprio.

Assim, as mudanças na fase móvel e na taxa de fluxo promovem alta e significativa variação no pico de tempo de retenção do onco A. Em geral, altos desvios-padrão residuais do teor de onco A podem ser obtidos com baixa vazão ($0,66 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e fase móvel composta por acetonitrila: água acidificada (26,5: 73,5, v/v). Esse resultado era esperado, uma vez que a posição de pico é fortemente influenciada pela taxa de fluxo e a polaridade da fase móvel deslocando o pico do analito (MCNAIR, 2007). Um deslocamento significativo para o tempo de retenção dos picos onco A foi obtido; no entanto, esses efeitos não afetaram a área do pico. Portanto, o método desenvolvido foi considerado robusto, com alta sensibilidade para quantificação de onco A.

6.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO CLAE-UV

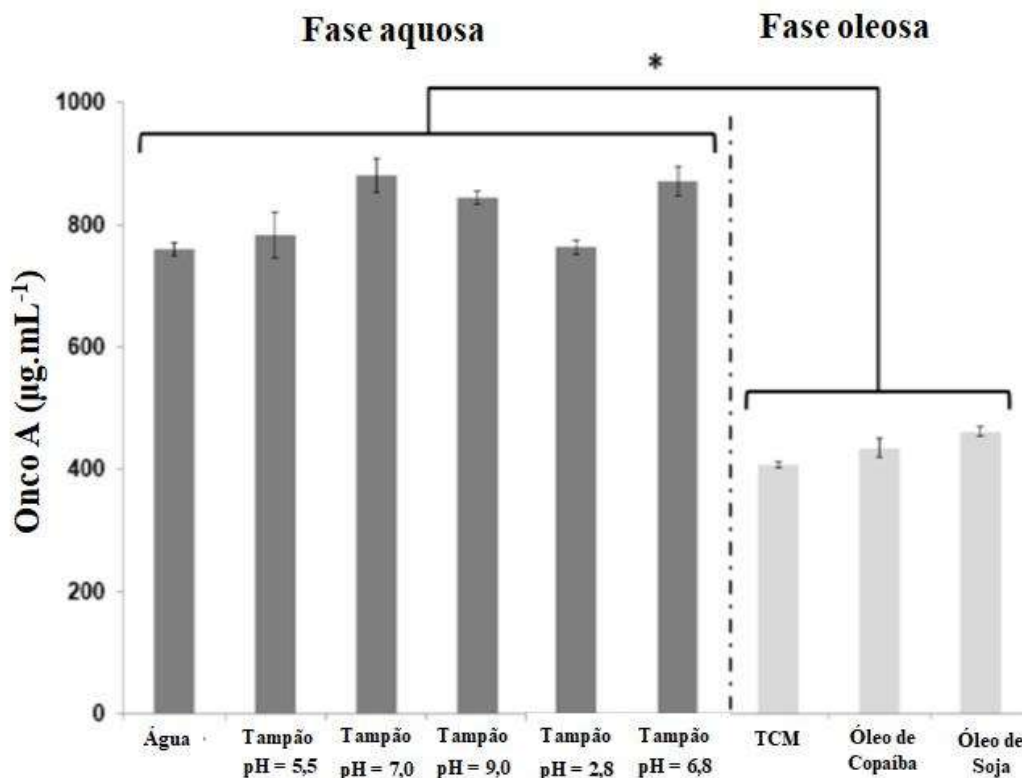
Neste estudo, o método analítico validado foi aplicado para quantificar a quantidade de onco A em diferentes meios, a fim de determinar a solubilidade e o coeficiente de partição do fármaco. Estes meios foram seleccionados tendo em vista a concepção de formulações farmacêuticas contendo onco A e outras matrizes em que é requerida a incorporação máxima deste metabólito secundário.

6.2.1 Estudo de Solubilidade

A solubilidade do onco A foi determinada em água deionizada, soluções de tampão borato a pH 5,5, 7,0 e 9,0; tampão fosfato farmacopeicos com pH = 2,8 (pH gástrico) e 6,8 (pH intestinal) e óleos: TCM, copaíba e soja (Figura 28).

A Figura 28 indica que a onco A foi mais solúvel em tampão pH = 7 ($880,9 \pm 27,9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em tampão fosfato com pH = 6,8 ($870,5 \pm 24,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), o qual simula o pH intestinal. Ademais a solubilidade da onco A em tampão ligeiramente maior que em água, corroborando com dados da literatura, os quais afirmam que quinonas apresentam-se solúveis em soluções aquosas e que algumas propriedades físico químicas tal como o seu potencial redox e solubilidade são influenciados pelo pH do meio (GUO *et al.*, 2014; SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016).

Figura 28 - Solubilidade da onco A em diferentes solventes a 25 °C.



Fonte: autor próprio.

Não houve diferença estatística entre a solubilidade da onco A em TCM ($406,9 \pm 5,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), óleo de copaíba ($434,8 \pm 15,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e óleo de soja ($461,7 \pm 8,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O TCM é constituído por triglicerídeos de cadeias médias, essencialmente os triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (BRUXEL *et al.*, 2012), enquanto que o óleo de copaíba demonstra a presença de compostos resinosos apolares na sua composição (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2016), já o óleo de soja consiste de triacilgliceróis misturados a diferentes proporções de ácidos graxos (51% de ácido linoléico, 25% de ácido oleico, 10% de ácido palmítico, 7% de ácido linolênico e 5% de ácido esteárico) (BISWAS *et al.*, 2008). Portanto, o caráter mais hidrofílico da onco A e consequentemente a sua menor afinidade aos constituintes dos referidos óleos podem explicar essa diminuição na solubilidade nos óleos de soja, copaíba e Triglicerídeos de Cadeias Médias.

6.2.2 Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição de uma molécula é um parâmetro importante para desenvolvimento de formulações farmacêuticas, uma vez que, reflete nas propriedades de

difusão passiva da molécula através de um sistema multicompartimental (RAMA *et al.*, 2006; JBEYLI; KREESLER, 2017). A determinação do coeficiente de partição da onco A em diferentes óleos e água é importante para o desenvolvimento de formulações (emulsões, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas), pois, através dele, sabe-se previamente a afinidade do fármaco pelo óleo em uma dispersão aquosa (DUARTE JÚNIOR, 2016).

O coeficiente de partição é representado pela concentração de substrato em óleo ($C_{\text{óleo}}$) em relação à sua concentração em água ($C_{\text{água}}$) em equilíbrio e pode ser calculado a partir da Equação 12 (JBEILI; KREESLER, 2017).

$$P = \frac{[fármaco]_{\text{óleo}}}{[fármaco]_{\text{água}}} \quad (12)$$

Além disso, o coeficiente de partição estima como o fármaco é transportado entre diferentes ambientes biológicos e é geralmente aplicado para prever a hidrofobicidade de uma molécula (BANNAN *et al.*, 2016). O coeficiente de partição de onco A entre água e diferentes solventes lipofílicos é mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Solubilidade da onco A e coeficiente de partição em diferentes fases.

Amostras	Fases óleo/ água	Concentração onco A ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	P (óleo/água)	Log P
1	n-octanol/	3469,3	15,2	4,295	0,63
	água	810,5	8,7		
2	TCM/	226,3	4,2	0,295	- 0,53
	Água	767,1	6,5		
3	Óleo de Copaíba/	250,8	7,4	0,328	- 0,48
	Água	762,4	5,3		
4	Óleo de soja/	263,5	8,4	0,352	- 0,45
	Água	747,6	6,3		

DP: Desvio padrão. Fonte: autor próprio.

Consistente com os resultados de solubilidade determinados anteriormente no presente estudo, o coeficiente de partição n-octanol/água (logP) foi de 0,63. Quando a fase lipofílica foi triglicerídeo de cadeia média, óleo de copaíba e óleo de soja, os coeficientes de partição onco A foram de -0,53, -0,48 e -0,45, respectivamente). As pequenas diferenças observadas

entre os valores do coeficiente de partição podem ser explicadas pela composição do testou óleos vegetais formados por ácidos graxos de cadeia longa e triglicerídeos de cadeia média. Estes valores bastante baixos dos coeficientes de partição onco A ($\text{LogP} < 1$) são explicados pela alta solubilidade do onco A na fase aquosa e sua baixa solubilidade nas fases oleosas. Os valores de LogP foram calculados usando a relação ao n-octanol/água, Óleo de soja/água, TCM/água e Óleo de Copaíba/água. Os valores logP experimentais apresentados na Tabela 7, corroboram com os dados do estudo de solubilidade realizado no presente estudo, comprovando que a onco A é possui uma caráter mais hidrofílico, caracterizado por valores de P e LogP inferior a 1 (WATTANASIN *et al.*, 2014).

Quando a fase lipofílica era constituída por os óleos de soja, copaíba e MCT os valores calculados de P sugerem um particinamento maior para a fase aquosa, por outro lado a partição da onco-A em n-octanol/água apresentou um valor de P de 4,295 (Tabela 7). Este valor bastante elevado pode ser explicado pela estrutura química do n-octanol que possui uma cabeça polar devido a presença de uma hidroxila livre e uma cadeia apolar de hidrocarboneto (WATTANASIN *et al.*, 2014). Dessa forma, a hidroxila livre do álcool fica disponível para formar ligações de hidrogênio com os grupos funcionais característicos das quinonas, tais como hidroxila, carbonila e metoxila (ABRAHAM *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2014; SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016), favorecendo uma maior extração da onco A pelo n-octanol.

6.3 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

O ITC é um método para determinar as constantes de afinidade e parâmetros termodinâmicos das interações hospede-hóspedeiro e é baseado na medição direta de mudanças de calor durante a interação (ZHENG *et al.*, 2014). Em adição, a avaliação de fenômenos de interação intermolecular entre onco A a as diferentes CDs, é importante para o conhecimento das constantes de ligação e dos parâmetros termodinâmicos associados ao equilíbrio dessa associação. Neste estudo, os valores dos parâmetros termodinâmicos derivados da entalpia descrevendo as interações intermoleculares que ocorrem entre o onco A e os CDs (β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD, γ -CD e HP- γ -CD), em solução aquosa a 25 °C são apresentados na (Tabela 8).

Tabela 8 - Estequiometria (n), constante de ligação (K), entalpia (ΔH), entropia ($T\Delta S$) e ligação da energia livre de Gibbs (ΔG) de onco A com CD a pH 7,0 de acordo com um modelo único de ligação local.

Amostra	n (Estequiometria)	K (M^{-1})	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	$T\Delta S$ ($kJ.mol^{-1}$)	$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ($kJ.mol^{-1}$)
β-CD	0,473 $\pm$ 0,04	1620 $\pm$ 0,47	-1,24 $\pm$ 0,11	17,08 $\pm$ 0,18	-18,32 $\pm$ 0,07
γ -CD	1,110 $\pm$ 0,13	1810 $\pm$ 0,0	-1,01 $\pm$ 0,07	17,61 $\pm$ 0,07	-18,61 $\pm$ 0,00
HP-β-CD	0,780 $\pm$ 0,13	890 $\pm$ 48	-1,19 $\pm$ 0,14	16,50 $\pm$ 0,85	-17,69 $\pm$ 0,99
SBE-β-CD	1,400 $\pm$ 0,19	2220 $\pm$ 610	-0,74 $\pm$ 0,17	18,26 $\pm$ 0,88	-19,00 $\pm$ 0,71
HP-γ-CD	1,760 $\pm$ 0,01	3175 $\pm$ 295	-0,43 $\pm$ 0,03	19,54 $\pm$ 0,25	-19,98 $\pm$ 0,23

Fonte: autor próprio.

A estequiometria é comumente usada como parâmetro de ajuste ao calcular as ligações intermoleculares a partir de dados de ITC. Frequentemente, os valores estequiométricos determinados diferem dos valores inteiros esperados (GHAI; FALCONER; COLLINS, 2011). Assim, os perfis térmicos de titulação isotérmicas podem ser ajustados ao modelo no qual o processamento de dados é direto e pode ser feito usando os algoritmos de ajuste simples de "de um único sítio de ligação". Nesse modelo, $n > 1$ significa que as moléculas do titulante interage em uma razão molar maior que a molécula contida na solução titulada (MUN; RHO; KIM, 2009; GHAI; FALCONER; COLLINS, 2011; HUANG; LAO, 2016). Enquanto que para $n < 1$, sugere-se que as moléculas apresentam uma interação típica de razão molar de 1:1 (GHAI; FALCONER; COLLINS, 2011).

O fato de a estequiometria de interação apresentar uma razão molar para o HP- γ -CD (1,76 $\pm$ 0,01) em comparação com outros CDs implica que uma média de uma a duas moléculas de HP- γ -CD ocorreu com uma molécula de onco A (MUN; RHO; KIM, 2009), indicando que a HP- γ -CD, dentre as demais CDs tituladas, apresenta maior capacidade de acomodar a molécula onco A em sua cavidade. Este efeito está associado à inserção direta de onco A na cavidade HP- γ -CD formada por 8 unidades de glicopirranose com diâmetros da cavidade interna correspondentes a 7,5-8,3 Å e volume de 427 Å³ (DEL VALLE, 2014).

Do ponto de vista termodinâmico, a interação entre uma molécula hospedeira e uma molécula de CD é mais forte e a estabilidade do complexo é maior quando os valores de K são maiores e quando a ΔH é mais exotérmico. A interação é considerada mais espontânea quando a ΔG é mais negativa (SEGURA-SANCHEZ *et al.*, 2009). A constante de formação

do complexo é um parâmetro derivado que indica a força de ligação de um fármaco com um CD num complexo de inclusão formado, que é considerado como um índice para a escolha de um CD como candidato para utilização em formas de dosagem farmacêutica (LOFTSSON; BREWSTER, 2010). Embora o ITC permita caracterizar de constantes de baixa afinidade (menores que 10 M^{-1}) (WENZ *et al.*, 2008) e constantes de alta afinidade (maiores que 10^7) (GOMEZ-BIAGI; JAGT; NITZ, 2010), a maioria desses complexos, a constante de afinidade (K) cai na faixa de 10^2 a 10^5 M^{-1} (CONNORS, 1997).

Em geral, valores elevados de K indicam que o equilíbrio irá se mover em direção à formação de um complexo de inclusão hóspede-hospedeiro mais estável (LOFTSSON; BREWSTER, 2010). Constantes de formação de complexos Onco A:CD indicaram afinidade maior afinidade da HP- γ -CD com grupos funcionais apolares de onco A incluídos em sua cavidade hidrofóbica ($K = 3175 \pm 295 \text{ M}^{-1}$) em comparação com outros CDs (HP- γ -CD > SBE- β -CD > γ -CD > β -CD > HP- β -CD) (Tabela 7). Ademais, um valor de $K > 1000 \text{ M}^{-1}$ afinidade entre hóspede e hospedeiro e estabilidade do complexo onco A: HP- γ -CD (CONNORS, 1997).

A termodinâmica da complexação reflete a natureza das interações não-covalentes que ocorrem entre as moléculas hóspede e CD (INOUE *et al.*, 1993). De fato, muitos eventos, incluindo dessolvatação de moléculas de água ligadas à molécula hóspede e/ou ao CD e formação de ligações fracas (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas), ligações eletrostáticas, entre a molécula hóspede e a CD resultam em variações entálpicas e entrópicas (SEGURA-SANCHEZ *et al.*, 2019).

Como pode ser observado na Tabela 7, a reações de complexação da onco A com as CDs foram exclusivamente processos exotérmicos, confirmado pelas mudanças favoráveis de entalpia ($\Delta H < 0$) das interações hóspede-hospedeiro. β -CD e seu derivado HP- β -CD apresentaram maiores valores de ΔH de -1,24 e -1,19 kJ.mol^{-1} , respectivamente. Este comportamento é devido à contribuição das interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, liberação de moléculas de água da cavidade de CD, a formação de ligações de hidrogênio e outras interações fracas (LOPÉZ-NICOLÁS *et al.*, 2013). No entanto, valores positivos altos de efeitos entrópicos revelaram que a complexação da onco A com CDs é controlada por contribuição entrópica favorável ($|\Delta H| < |T\Delta S|$). HP- γ -CD apresentou o maior efeito de entropia valor (19,54 kJ.mol^{-1}) quando comparado a outros CDs. Como relatado, os altos valores positivos dos efeitos entrópicos da contribuição do processo de solvatação indicam que o processo de ligação é comprovadamente favorável pelas interações conduzidas pela entropia (ZARRABI; VOSSOUGH, 2015; NEACSU, 2018).

Moléculas de água dentro da cavidade não polar das CDs formam uma estrutura semelhante à gaiola que reduz a entropia. Quando o onco A associa-se com as moléculas de CD, moléculas de água restritas e altamente ordenadas ligadas por ligações de hidrogênio ou na vizinhança direta de grupos não polares da molécula ou dentro da cavidade de CD são liberadas na água, com um grande aumento na entropia (MAYTI, 2016; IGNACZACK; PALECZ; BELICA-PACHA, 2017). Além disso, o HP- γ -CD ($19,54 \pm 0,25 \text{ kJ.mol}^{-1}$) apresentou um efeito de entropia maior do que o γ -CD ($17,61 \pm 0,07 \text{ kJ.mol}^{-1}$), que possui o mesmo diâmetro da cavidade formada pela 8 unidades de glucopirranose. Essa diferença pode ser explicada pela presença de grupos hidroxila presentes na superfície externa do γ -CD que podem aumentar a solubilidade das moléculas de onco A em torno da superfície do HP- γ -CD (NEACSU, 2018).

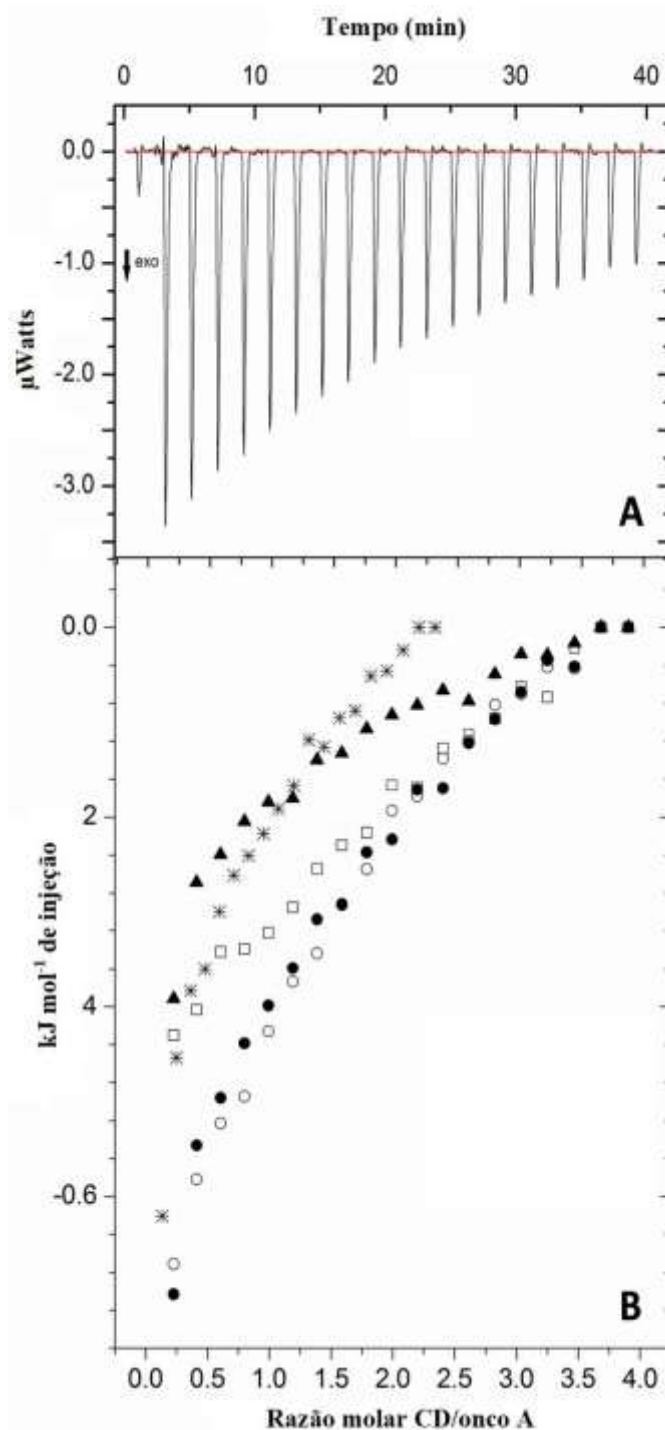
A mudança de energia livre de Gibbs (ΔG) é o parâmetro energético mais importante medido pelo ITC. ΔG indica que a formação de complexos de inclusão hospedeiro em solução aquosa é um processo espontâneo, com valores mais negativos de ΔG favorecendo maior afinidade de ligação (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2017). Os valores negativos da variação de energia livre de Gibbs (ΔG) confirmam a formação espontânea termodinamicamente favorável dos complexos de inclusão onco A: HP- γ -CD (Tabela 7). A partir dos dados de ΔG , a estabilidade dos complexos de inclusão diminuiu na seguinte ordem: HP- γ -CD > SBE- β -CD > γ -CD > β -CD > HP- β -CD. Os resultados das medições de ITC possibilitaram a escolha do complexo de inclusão mais estável, onco A: HP- γ -CD, a ser preparado e caracterizado fisicoquimicamente e por modelagem molecular para futuras aplicações em sistemas de liberação de fármacos.

Os fluxos de calor exotérmico que foi liberado após injeções sucessivas de alíquotas de 2 μL de CDs numa solução de onco A foram integrados e expressos como uma função da razão molar entre os dois reagentes. Uma isoterma representativa da reação de calor e do perfil de ligação de onco A (1,31 mM) e CDs (25 mM, exceto β -CD = 15 mM) são mostrados na Figura 28. Cada pico na isoterma de ligação (Figura 29A) representa uma única injeção da solução de CDs na solução onco-A.

O primeiro pico para a primeira injeção de CD na solução onco A foi menor que o do segundo (Figura 29A), que é um fenômeno comum de efeito de diluição em experimentos de ITC. Portanto, os efeitos energéticos da diluição das soluções CD, bem como os efeitos da titulação das soluções onco A com os solventes investigados, foram subtraídos dos efeitos energéticos medições de titulação de onco A com soluções de CD (SEGURA-SANCHEZ *et*

al., 2009). O perfil de ligação responsável pela formação do complexo de inclusão CD/onco A foi um processo exotérmico (Figura 29B).

Figura 29 - Titulação calorimétrica de CDs com onco A a 25 °C: isoterma de calor de reação a partir da integração de dados brutos de injeções automáticas sequenciais de CDs (25 mM, exceto para β -CD = 15 mM) numa solução de onco A (1,31 mM) (A).



β -CD (*); HP- β -CD ($\blacktriangle$); SBE- β -CD ($\bullet$); γ -CD ($\circ$) e HP- γ -CD ($\square$) (B). Fonte: autor próprio.

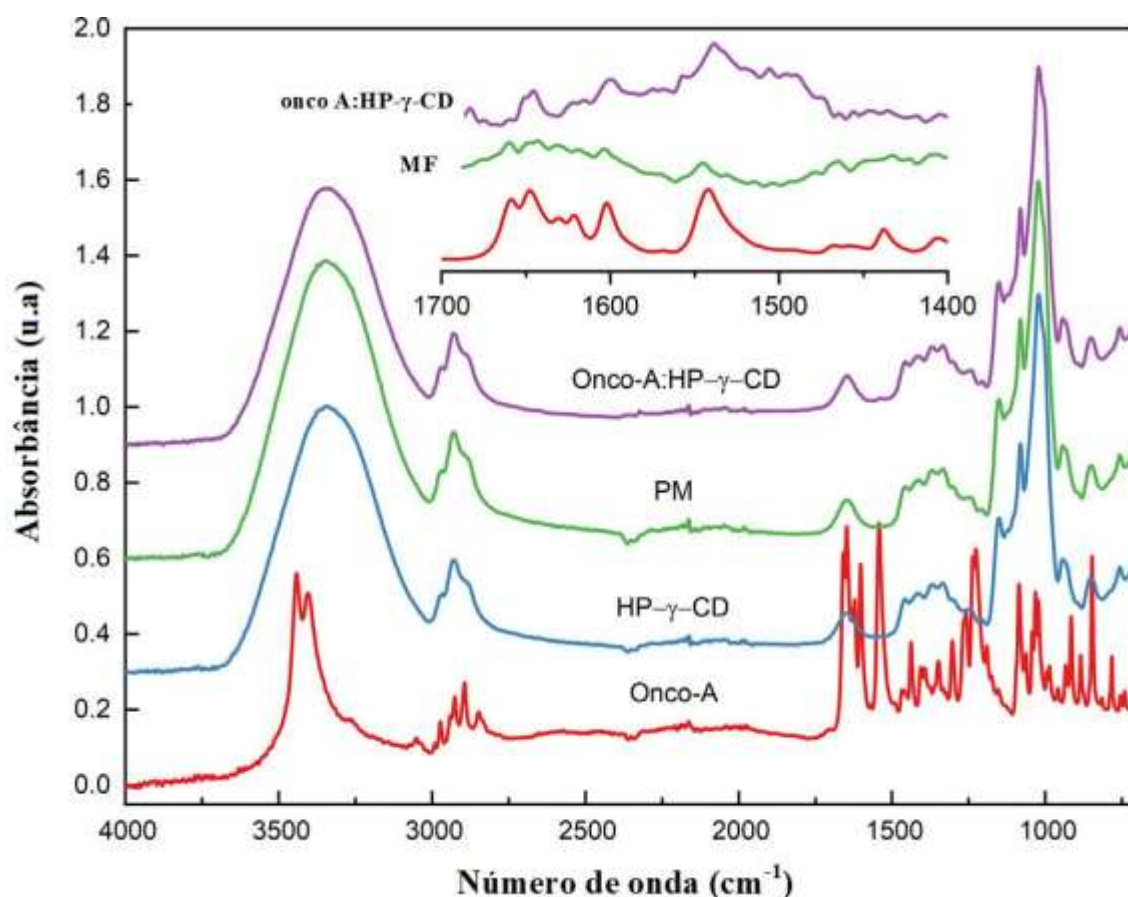
6.4 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ONCO A:HP- γ -CD

A caracterização do complexo de inclusão foi realizada a fim de obter informações adicionais sobre o CI onco A:HP- γ -CD, que apresentou melhor formação hóspede-hospedeiro em solução aquosa.

6.4.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier da mistura física e do complexo de inclusão, assim como as matérias-primas, são mostrados na Figura 30. O espectro infravermelho do onco A está de acordo com o anteriormente relatado (JOSHI *et al.*, 2013), confirmando a identidade química da amostra. Por outro lado, as bandas associadas ao HP- γ -CD dominam os espectros da mistura física e do complexo de inclusão.

Figura 30 - Espectros infravermelho do complexo de inclusão onco A:HP- γ -CD e mistura física e na proporção molar 1: 1; HP- γ -CD e onco A.



Fonte: autor próprio.

Assim, as bandas de absorção observadas para a HP- γ -CD são o estiramento OH (3340 cm^{-1}), estiramento CH ($2970\text{--}2880\text{ cm}^{-1}$), flexão OH (1640 cm^{-1}), flexão CH ($1450\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$) e alongamento de CO/CC ($1150\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$). Contudo, a inspeção direta desses espectros não mostra qualquer evidência da onco A, nem na mistura física nem no complexo de inclusão que pudesse ser preditivo de formação de CI. Dessa forma, obteve-se espectros de infravermelhos reduzidos foram calculados subtraindo o espectro HP- γ -CD daqueles da mistura física e do complexo de inclusão.

No espectro reduzido da Figura 30 é possível identificar vários picos associados ao onco A. Nos espectros reduzidos, é possível observar as bandas relacionadas ao alongamento de carbonila em torno de 1660 cm^{-1} e C = C que se estende entre 1650 e 1550 cm^{-1} (JOSHI *et al.*, 2013). Todas as bandas observadas de onco A mudam para números de onda mais baixos no complexo de inclusão, enquanto estão na mesma posição na mistura física e matéria-prima. Isso sugere que o onco A está em um ambiente/conformação diferente na amostra onco A:HP- γ -CD, indicando a formação de um complexo de inclusão.

6.4.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os deslocamentos químicos dos prótons da onco A e da HP- γ -CD foram estudados através de análise de RMN de ^1H em D_2O , de modo a fornecer evidência para interações intermoleculares e intramoleculares entre as moléculas onco A e HP- γ -CD. As variações nos deslocamentos químicos (δ) são mostradas na Tabela 9. Deslocamentos dos sinais ^1H de onco A e HP- γ -CD acima e abaixo do campo magnéticos confirmaram interações moleculares por complexação. O espectro de RMN ^1H do complexo onco A:HP- γ -CD não apresentou novos picos, indicando que a complexação era de fato um processo dinâmico, no qual moléculas onco A estavam passando por uma troca rápida entre estados livre e complexado (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2019).

Tabela 9 - Dados dos deslocamentos químicos (ppm) de ^1H de RMN da HP- γ -CD e onco A no estado livre e no complexo de inclusão.

H	δ_{Livre}	δ_{Complexo}	$\Delta \delta$
HP-γ-CD			
1	5,025	5,019	-0,006
2	3,532	3,532	0,000
3	3,832	3,818	-0,014
4	3,377	3,378	0,001
5	3,764	3,754	0,009
6	3,604	3,605	0,002
Onco A			
3	5,909	5,933	0,024
6	6,078	6,122	0,044
7	1,970	1,865	-0,106
7	2,799	2,899	0,100
8	3,714	3,754	0,040
9	2,461	2,468	0,007
9	2,752	2,739	-0,014
10	6,587	6,520	-0,067
11	4,216	4,279	0,064
12	0,777	0,787	0,011
OCH ₃	3,763	3,776	0,013

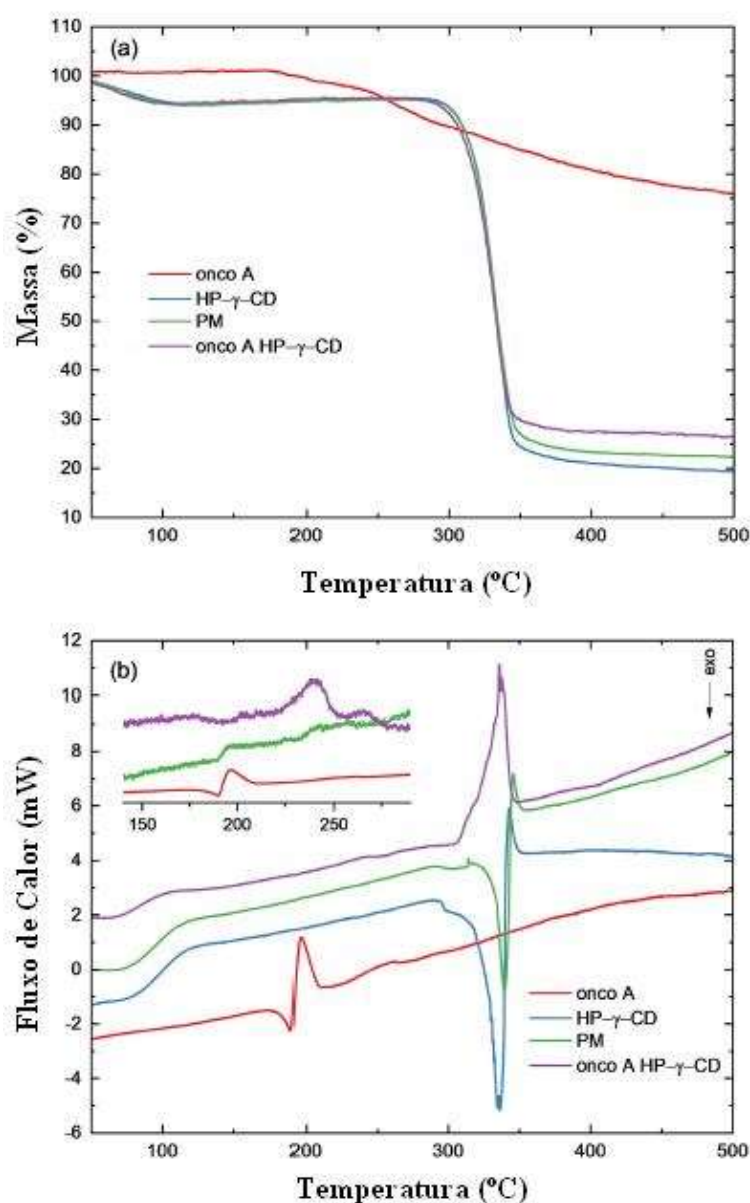
$\Delta \delta$ é definido como a diferença nos deslocamentos químicos na presença e na ausência do outro reagente ($\Delta \delta = \delta_{\text{Complexo}} - \delta_{\text{livre}}$). Fonte: autor próprio.

Os valores de $\Delta \delta$ dos protons H3 (-0,014 ppm) e H5 onco A (-0,009 ppm) indicam a formação do complexo de inclusão onco A:HP- γ -CD. O H5 da onco A mostra valores de $\Delta \delta$ de 0,009 ppm, sugerindo inclusão parcial da onco A na cavidade da HP- γ -CD. A Tabela 9 também mostra os deslocamentos de ^1H de RMN do onco A na ausência ou presença de HP- γ -CD. Estes resultados podem ser devidos a variações na densidade eletrônica dos anéis aromáticos do onco A. Devido ao maior efeito de proteção nos prótons H6, H7, H8, H10 e H11, pode-se supor que a molécula de onco A entra preferencialmente através do Carbono fenólico no qual o grupo hidroxila e um grupo hidroximetila estão localizados na borda larga da cavidade da ciclodextrina (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2019).

6.4.3 Análise Térmica

Os resultados da análise térmica apresentados na Figura 31A e na Figura 31B também suportam a formação de um complexo de inclusão onco A:HP- γ -CD. Os principais eventos observados nas curvas termogravimétricas estão relacionados ao HP- γ -CD. A desidratação de HP- γ -CD é evidenciada por um evento abaixo de 100 °C, que é seguido por decomposição acima de 300 °C.

Figura 31 - Análise térmica, DSC (A) e TG (B) de onco A; HP- γ -CD; mistura física e complexo de inclusão onco A: HP- γ -CD na proporção molar 1: 1.



Fonte: autor próprio.

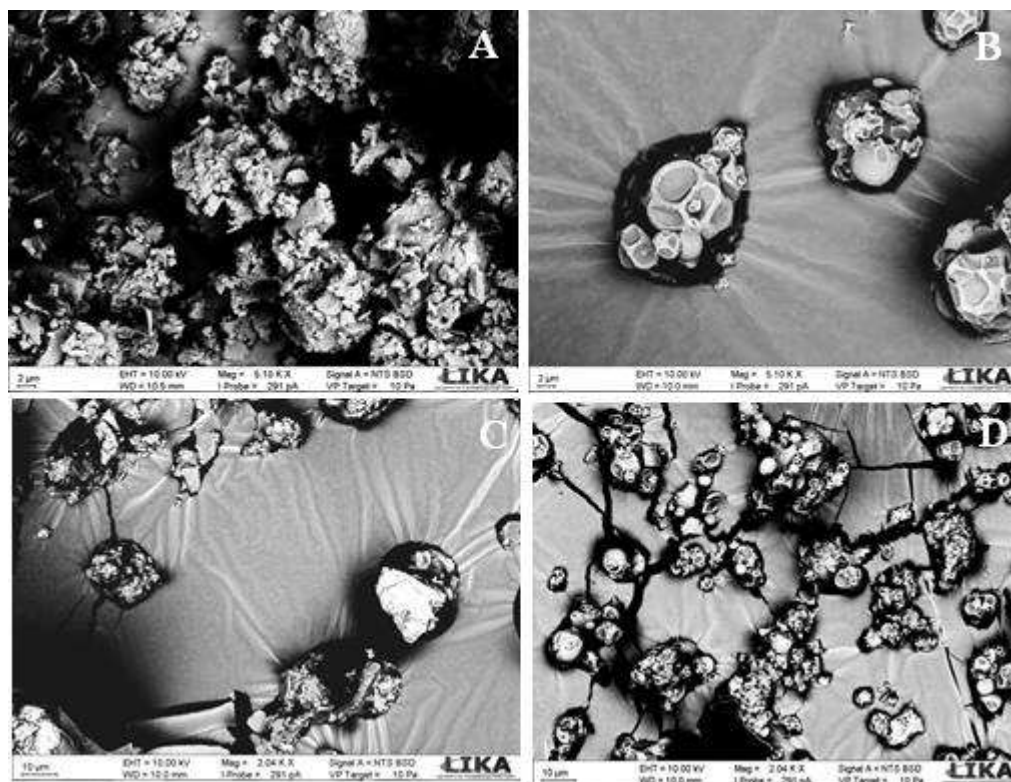
Estes eventos têm uma contrapartida nas curvas DSC como picos endo/ exotérmicos. Por outro lado, o onco A decompõe-se a cerca de 180 °C. No caso da mistura física e do complexo de inclusão, as curvas termogravimétricas não apresentam evidências de onco A. Utilizando uma abordagem semelhante à aplicada aos espectros de infravermelho, calculou-se as curvas DSC reduzidas subtraindo-se da curvas de DSC do complexo onco A:curvas HP- γ -CD a curva da mistura física como mostrado na figura da Figura 31B.

A curva DSC reduzida da mistura física mostra um único evento em torno de 180 °C, que está em forte concordância com a fusão/decomposição do onco A, confirmando assim a presença deste composto no estado cristalino. Embora a onco A tenha sido identificado no complexo de inclusão por espectroscopia no infravermelho, a curva DSC reduzida correspondente não exibe seu evento de fusão/decomposição. De fato, dois eventos endotérmicos com temperaturas de início de cerca de 230 °C e 260 °C são observados nesta curva. A ausência de eventos característicos de fusão/decomposição no complexo de inclusão onco A: HP- γ -CD sugere a formação de um complexo de inclusão, uma vez que a onco A foi identificado na amostra, não no estado cristalino. Assim, os eventos endotérmicos de alta temperatura poderiam ser atribuídos à liberação de onco A do complexo de inclusão (XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2019).

6.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens da MEV da Onco-A, HP- γ -CD, CI Onco-A: HP- γ -CD e sua mistura física foram ilustrados na Figura 32. Onco A pura existia em cristais irregulares, com dimensões bastante heterogêneas (Figura 32A), enquanto a HP- γ -CD mostrou a presença estruturas esféricas com cavidades, com diferentes dimensões, que tenderam a se aglomerar (Figura 32B). Na mistura física, as moléculas característicos de HP- γ -CD misturados com cristais de onco A ou aderidos à sua superfície, foram claramente observados, indicando ausência de formação de CI (Figura 32D). No entanto, o complexo de inclusão Onco A:HP- γ -CD apareceu na forma de partículas irregulares em blocos (Figura 32C) na qual desapareceu a morfologia original dos componentes individuais. Este resultado indica a presença de uma única fase sólida na figura Figura 32C, consequentemente, pode ser considerado sugestivo da formação de um complexo de inclusão entre a Onco-A e HP- γ -CD.

Figura 32 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da onco A; HP- γ -CD; complexo Onco-A: HP- γ -CD, mistura física na proporção 1:1.



A) Cristais da onco A; B) HP- γ -CD; C) Complexo onco A: HP- γ -CD; D) Mistura física de onco A e HP- γ -CD. Fonte: autor próprio.

6.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS CONTENDO ONCO A

6.5.1 Microesferas de PLGA

Foi observado macroscopicamente que a molécula não foi encapsulada, pois o pelete após as lavagens ficou competamente branco e o sobrenadante com a coloração vermelha, característica da Onco A em solução aquosa, conforme a Figura 33.

A composição do polímero desempenha um papel muito decisivo na determinação da hidrofiliicidade e taxa de degradação de qualquer matriz de entrega de fármacos (GREF *et al.*, 1994). O poliéster PLGA é um copolímero de Poli ácido láctico (PLA) e Poli ácido glicólico (PGA). Com relação ao design e desempenho, o PLGA é o biomaterial mais bem definido disponível para entrega de fármacos (MAKADIA; SIEGEL, 2011). Neste trabalho de tese, utilizou-se PLGA (50:50) que refere-se a um copolímero que compreende 50% de ácido láctico e 50% de ácido glicólico. Nessa proporção, com maior teor de glicólidos, o polímero

de PLGA é mais hidrofílicos e amorfo, possuindo assim menor tempo de deterioração e uma maior capacidade na formação de poros (SCHLIECKER *et al.*, 2003).

Considerando que utilizou-se para a obtenção das microesferas o PLGA (50:50), é possível sugerir que a presença de poros dentro das micropartículas formadas favoreceram a liberação da molécula de onco A, uma vez aumenta a permeação da microesfera por moléculas de água de hidratação, favorecendo a difusão e dissolução da onco A no meio de dispersão (GENTILE *et al.*, 2016). Isto pode ser explicado com base no fato de que o ácido glicólico é mais hidrofílico e, portanto, tende a absorver uma grande quantidade de água (SCHLIECKER *et al.*, 2003).

Figura 33 - Formulação de Microesferas de PLGA após a segunda lavagem (esquerda) e após a primeira lavagem (direita).



Fonte: autor próprio.

6.5.2 Micropartículas de Alginato

Foi observado macroscopicamente que após o gotejamento da solução de alginato contendo a onco A, na solução de Cloreto de Cálcio, esta adquiriu coloração rosa característica da onco A em solução, sugerindo que durante o processo de gelificação iônica entre o Alginato e o Ca^{+2} , a onco A ficou solubilizada na solução de CaCl_2 , uma vez que as partículas de alginato formadas ficam transparentes, conforme mostrado na Figura 34.

Figura 34 - Micropartículas de alginato dispersas em solução aquosa de CaCl_2 .



Fonte: autor próprio.

É provável que a onco A encapsulada pelo método de gelificação iônica, vazou durante o processo de agitação, após a solidificação das micropartículas devido à alta porosidade das microesferas de alginato-Ca (ZHANG *et al.*, 2011). Essa migração pode ser justificada pela hidrossolubilidade da onco A ($759,6 \pm 10,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o que favorece a difusão da respectiva molécula da rede de gel de alginato para o meio aquoso (CaCl_2) durante o processo de gelificação ionotrópica (MENNINE *et al.*, 2012). Estes geis são compostos por 99-99,5% de água com o resto sendo de alginato. Dependendo da quantidade de cálcio presente no sistema, essas associações inter-cadeias podem ser temporárias ou permanentes (GEORGE; ABRAHAM, 2016).

As micropartículas de alginato para oncapsulação da onco A foram obtidas à 2% (p/v) de alginato e 3% (p/v) de CaCl_2 . É possível que a modificação de parâmetros, a exemplo de aumento na concentração dos reagentes, favorecesse a encapsulação da onco A. Isso justifica-se por pelo fato de que com menores concentrações de cálcio, associações inter-cadeias são temporárias, originando soluções altamente viscosas. Por outro lado, o aumento na concentração de cálcio, favorece a precipitação ou gelificação com associações permanentes

das cadeias, o que favoreceria o “aprisionamento” onco A na malha de alginato (GEORGE; ABRAHAM, 2016).

6.5.3 Nanoesferas de PCL

A formulação ficou macroscopicamente estável, homogênea e com aspecto azulado na superfície, característico de Efeito Tyndall. Contudo, após a centrifugação com o Amicon®, grande parte da molécula passou para o ultrafiltrado (Figura 35).

Figura 35 - Dispersão de Nanoesferas de PCL após o processo de Ultrafiltração.



Fonte: autor próprio.

PCL é um polímero hidrofóbico e solúvel em hidrocarbonetos aromáticos, clorofórmio, cicloexano, diclorometano e 2-nitroprapano (KO *et al.*, 2015). Contudo, os estudos de solubilidade comprovam um caráter hidrofílico da onco A (TAVARES *et al.*, 2019). Possivelmente, no processo de nanoprecipitação, em decorrência da baixa afinidade da onco A pelo PCL, há uma migração das moléculas da quinona para a fase aquosa.

Dessa forma, considerando que nas nanoesferas de PCL contendo onco A, o encapsulamento da respectiva quinona seria fornecido apenas por matriz polimérica

hidrofóbica e estabilizada por moléculas do tensoativo polaxamer-188 (BAZYLINSKA *et al.*, 2014). Permite-se afirmar que maior parte da onco A não estava encapsulada e sim solubilizada no meio de dispersão, justificando-se a intensidade na coloração vermelha no filtrado, após a ultracentrifugação.

6.5.4 Nanocápsulas de PCL Revestidas com Quitosana

As nanocápsulas de PCL com núcleo oleoso de TCM revestidas com quitosana foram obtidas. A formulação foi preparada com uma solução de quitosana a 0,5% em uma solução de ácido acético a 1%. O tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta foram determinados no equipamento Analizador de partículas Analizador de partículas (ZetaSizer Nano-ZS90, Malvern, Worcestershire, UK), utilizando a técnica de espectroscopia de autocorrelação de fótons e mobilidade eletroforética, respectivamente. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Característica das nanocápsulas de PCL revestidas com quitosana.

Formulação	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	%EE
NC	151,6 ± 2,83	0,070	- 12,6 ± 0,79	----
OncoA-NC	154,1 ± 0,87	0,107	- 29,3 ± 0,78	10,9
NCQT	185,9 ± 2,25	0,241	+ 34,8 ± 1,0	----
OncoA-NCQT	198,8 ± 2,02	0,217	+ 31,9 ± 0,9	12,8

Fonte: autor próprio.

6.5.5 Eficiência de Encapsulação da Onco A em Nanocápsulas

O método proposto também foi aplicado para quantificar onco A encapsulada em nanocápsulas de PCL revestidas de quitosana. O conteúdo da onco A em onco A-NC foi 98,8% ($988,8 \pm 14,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para OncoA-NC e 99,6% ($995,8 \pm 26,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para Onco A-NCQT. O pico após a extração de nanocápsulas foi bem eluído com as mesmas características do curva padrão, apresentando simetria e sem áreas sobrepostas. O método desenvolvido mostrou-se eficaz e rápido para fins de quantificação de medicamentos e atende aos critérios de validação do método.

Isso permite afirmar que praticamente não houve perda de fármaco durante o processo de formulação. Todavia, a eficiência de encapsulação (%EE) de 10,9% para Onco A-NC e

12,8% em onco A-NCQT, demonstra pouca afinidade da onco-A pelo núcleo de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico. Esses resultados sugerem que a onco A apresenta um caráter mais hidrofílico, conforme já evidenciado pelos estudos de solubilidade e determinação experimental do coeficiente de partição. Esse resultado mostra-se importante no tocante a estudos de desenvolvimento de novas formulações de liberação controlada, capazes de veicular a oncocalixona A, buscando-se a obtenção de sistemas capazes de encapsular, veicular e proteger contra degradação e aumentar a biodisponibilidade, principalmente após administração por via oral, da respectiva quinona.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

- ✓ O método CLAE desenvolvido para quantificar onco A em diferentes meios foi validado de acordo com as diretrizes internacionais, sendo simples, preciso, robusto e econômico;
- ✓ Este método mostrou ser sensível para a determinação da onco A em fases aquosa e lipofílica;
- ✓ O método proposto apresentou baixos valores de LD e LQ, além de coeficientes de variância inferiores a 5% para exatidão e precisão, satisfazendo os requisitos de qualidade para pesquisa de fármacos;
- ✓ O método foi resistente a pequenas variações dos parâmetros analíticos, mostrando robustez na quantificação de Onco A;
- ✓ O método pode ser aplicado para medir a concentração de onco A em sistemas de liberação de fármacos;
- ✓ Os estudos de solubilidade comprovam que a onco A é hidrossolúvel, sem interferência com a variação de pH (5,5 e 9,0);
- ✓ A solubilidade da Onco A em óleos de soja, de copaíba e triglicerídeos de cadeia média foi menor que em fase aquosa, sendo justificado pelos valores de coeficientes de partição inferiores a 1;
- ✓ Através da calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi possível investigar a termodinâmica e a natureza das interações supramoleculares entre onco A e CDs (β -, HP- β -, SBE- β -, γ - e HP- γ -CD);
- ✓ A baixa eficiência de encapsulação da onco A em nanocápsulas reflete a baixa afinidade da Onco A pelo núcleo oleoso, bem como a necessidade de desenvolver um nano ou microsistema de liberação de fármacos capaz de encapsular e veicular moléculas hidrofílicas.

8 PERSPECTIVAS

Estudos suplementares são necessários para encontrar uma formulação de liberação controlada, capaz de encapsular a onco A e a veicular por via oral. Assim, os resultados aqui apresentados serão norteadores para o desenvolvimentos destes sistemas, com perspectivas para a obtenção de sistemas mucoadesivos, capazes de encapsular uma molécula hidrofílica, ideal para a veiculação da onco A.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. *et al.* Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends-a review. **Foods Review International**, v. 28, p. 343-374, 2012.
- ABRAHAM, I. *et al.* Recent advances in 1,4-benzoquinone chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 3, p. 385-421, 2011.
- ADEOYE, O.; CABRAL-MARQUES, H. Cyclodextrin Nanosystems in Oral Drug Delivery: A Mini Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 521-531, 2017.
- AGNES, M. *et al.* Designed positively charged cyclodextrin hosts with enhanced binding of penicillins as carriers for the delivery of antibiotics: The case of oxacillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 480-491, 2017.
- AMPATZOPOULOS, I. G.; KOUSKOURA, M. G.; MARKOPOULOU, C. K. Coupling Classical Analytical Methods with Modeling in Routine Analysis Tests - Merits and Drawbacks. **Current Analytical Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 244-256, 2015.
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2009.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA: RDC N°166 de 24 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.
- AOAC. **Appendix K, Guideline for Dietary Supplement and Botanical**: Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2013.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ARAÚJO, A. A. S. *et al.* Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 303-314, 2003.
- ARROYO-MAYA, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Application of ITC in foods: A powerful tool for understanding the gastrointestinal fate of lipophilic compounds. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 5, p. 1026-1035, 2016.
- ATWOOD, J. L.; DAVIES, E. E. MACNICOL, D. D. Inclusion compounds. *In*: WOLFGANG, G. *et al.* Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry. London, London: Academic Press, 1984. p. 420.

BALLARD, S. T.; HUNTER, J. H.; TAYLOR, A. E. Regulation of tight-junction permeability during nutrient absorption across the intestinal epithelium. **Annual Review of Nutrition**, v. 15, p. 35-55, 1995.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactante combinations and development of a novel nanoemulsion for minimizing variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 410-420, 2010.

BALLHORN, D. J. *et al.* Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. **Public Library Of Science**, v. 4, n. 5, p. 5450, 2009.

BANERJEE, A.; LEE, J.; MITRAGOTRI, S. Intestinal mucoadhesive devices for oral delivery of insulin. **Biengineering and Translational Medicine**, v. 1, p. 338-346, 2016.

BANNAN, C. C. *et al.* Calculating partition coefficients of small molecules in octanol/water and cyclohexane/water. **Journal of Chemical Theory Computation**, v. 12, p. 4015-4024, 2016.

BARBATO, F. *et al.* Diclofenaco/ β -Cyclodextrin Binary System: A Study in Solution and in the Solid State. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 46, n. 3-4, p. 179-185, 2003.

BARNETT, K. L.; HARRINGTON, B.; GRAUL, T. W. Validation of liquid chromatographic methods. *In: Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. v. 1, p. 533-552, 2017.

BARRETO, A. C. H. *et al.* Magnetic nanosystem for cancer therapy using Oncocalyxone A, an antitumour secondary metabolite isolated from a Brazilian plant. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 18269-18283, 2013.

BAYEN, S. *et al.* Synthesis structure and electrochemical properties of 2,5 bis (Alkyl/arylomino) 1,4-benzoquinones and 2-arylomino-1,4 naphthoquinones. **Dyes and Pigments**, v. 75, n. 3, p. 770-775, 2007.

BAZYLINSKA, U. *et al.* Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 42-49, 2014.

BEIJA, M. *et al.* Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. **Cell Pres**, v. 30, n. 9, p. 485-496, 2012.

BENAVIDES, A. M. H. *et al.* Optimization of Countercurrent Supercritical Fluid Extraction of Minor Components from Olive Oil. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 78-85, 2014.

BENDER, E. A. *et al.* Hemocompatibility of poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 271-279, 2012.

BENDER, M.; KOMIYAMA, M. Cyclodextrin chemistry: reactivity and structure, concepts in organic chemistry. **Cyclodextrin Chemistry**, v. 6, p. 2-9, 1978.

BERTOLUCCI, S. K. V. *et al.* Development and Validation of an RP-HPLC Method for Quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2009.

BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and realibility of chemical measurements in natural product research. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 44-52, 2011.

BHASAKARAN, S.; MORIS, S.; ROUT, A. Gastrointestinal Mucoadhesive Patch System for Oral Administration of Metronidazole. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 3, n. 4, p.1497-1505, 2012.

BISWAS, A. *et al.* Soybean oil as a renewable feedstock for nitrogen-containing derivatives. **Energy & Environmental Science**, v. 1, p. 639-644, 2008.

BOUCHEMAL, K. *et al.* A comprehensive study on the inclusion mechanism of benzophenone into supramolecular nanoassemblies prepared using two water-soluble associative polymers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 98, n. 1., p. 57-64, 2009.

BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 11-12, p. 623-629, 2012.

BORMAN, P. *et al.* Method ruggedness studies incorporating a risk based approach: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 2, p. 101-13, 2011.

BOURGAUD, F. *et al.* Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BOYE, A. *et al.* Antinociceptive and antioxidant activity of an aqueous root bark extract of *Daniellia oliveri* (Rolfe) Hutch. & Dalziel (Fam: Leguminosae Fabaceae) in ICR mice. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 12, p. 36 -45, 2012.

BRAGAGNI, M.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Physical chemical characterization of binary systems of prilocaine hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 68, n.3-4, 437-45, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Caatinga**. 2018. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga.html>. Acesso em: 09 Nov 2018.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 3-10, 1996.

BRITO, N. M. *et al.* Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR, C. S.; SANTOS, E. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: Um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 882-888, 2004.

BROUN, P. *et al.* Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 27-38, 2006.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistema de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUDDOPALLI, B. M.; MOHAMED, Z. N. K.; DAVID BANJI, R. N. A. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, p. 381-387, 2017.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405-411, 2011.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v. 2. Brasília: EMBRAPA – Informação Tecnológica, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Pau branco-do-Sertão (*Auxemma oncocalyx*)**. Circular técnica. v. 153. Colombo-PR. 2008. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/314914/1/circtec153.pdf>. Acesso em: 12 Nov 2018.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CASSEZ, A *et al.* Ecoefficient catalytic hydrodechlorination of carbon tetrachloride in aqueous cyclodextrin solutions. **Catalysis Letters**, v. 108, n. 3-4, 209-214, 2006.

CASTRO, M. A. *et al.* A Novel Synthetic Route to Cytotoxic 1,4-Anthraquinones from 1,4-Benzoquinones. **Synthesis**, v. 19, p.3202-3208, 2005.

CE, R. *et al.* Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus ssp.* **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 511, p. 153-161, 2016.

CESTEROS, L. C.; GONZALEZ-TERESA, R.; KATIME, I. Hydrogels of β -cyclodextrin crosslinked by acylated poly(ethylene glycol): synthesis and properties. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 3, p. 674-679, 2009.

CHARNET, R. *et al.* **Análise de modelos de regressão linear com aplicações**. 1. ed. Campinas: Unicamp, 1999.

CHEN, M. C. *et al.* Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 865-879, 2013.

CHEN, M. M. *et al.* Sequential delivery of chlorhexidine acetate and bFGF from PLGA-glycol chitosan core-shell microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 15, p. 189-195, 2017.

CHENG, C. L.; SHALABH, GARG, G. Coefficient of determination for multiple measurement error models. **Journal of Multivariate Analysis**, v. 126, p. 137-152, 2014.

CHIOU, M. S.; LI, H.Y. Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads. **Chemosphere**, v. 50, p.1095-1105, 2003.

CHOI, G. *et al.* Emerging nanomaterials with advanced drug delivery functions; focused on methotrexate delivery. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 359, p. 32-51, 2018.

COOPER, A. *et al.* Heat does not come in different colours: entropy–enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, salvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. **Biophysical Chemistry**, v. 93, n. 2-3, p. 215-230, 2001.

COOPER, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 5, p. 557–563, 1999.

CONCEIÇÃO, J. *et al.* Cyclodextrins as excipients in tablet formulations. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 6, p. 1274-1284, 2018.

CONNORS, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. **Chemical Review**, v. 97, p. 1325-1357, 1997.

COSTA, C. O. *et al.* Electrochemical determination of Oncocalyxone A using an iron-phthalocyanine/Iron-porphyrin modified glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 697-673, 2008.

COSTA, C. O. *et al.* Oncocalyxone A: electrochemical, spectroscopic investigation and studies of its interaction with DNA, nucleobases and *N*-Acetylcysteine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 3, n. 6, p. 1174-1185, 2012.

COSTA, J. G. M. *et al.* Estudo fitoquímico de *Auxemma glazioviana* Taub. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 68-69, 2002.

COSTA, J. G. M. *et al.* Composition and larvicidal activity of essential oils from heartwood of *Auxemma glazioviana* Taub. (Boraginaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 539-542, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from *Auxemma oncocalyx*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n.8, p. 927-930, 2002.

CRINI G. Review A history of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 114, p. 10940-10975, 2014.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

D'ARCHIVIO, A. A. *et al.* Optimisation of temperatureprogrammed gas chromatographic separation of organochloride pesticides by response surface methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1423, p. 149-157, 2015.

DALAI-LAMA. **A Arte da Felicidade: Um Manual Para a Vida**. São Paulo: Martins Fontes, 2000.

DATE, A. A. *et al.* Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, n. 10, p. 1595-1616, 2010.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 21, n. 7, p. 21-25, 1997.

DEJAEGER, B.; VAN DER HEYDEN, Y. The use of experimental design in separation Science. **Acta Chromatography**, v. 21, n. 2, p. 161-201, 2009.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DESAI, P. P.; DATE, A. A.; PETRAVALI, B. B. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations opportunities and limitations. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 2, p. 87-95, 2012.

DI CARRO, M.; ARDINI, F.; MAGI, E. Multivariate optimization of headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of methylpyrazines in cocoa liquors. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 172-177, 2015.

DI, L.; KERNS, E. H.; CARTER, G. T. Drug-like property concepts in pharmaceutical design. **Current Pharmaceutical Designer**, v. 15, n. 19, p. :2184-2194, 2009.

DINAR, K. *et al.* Inclusion complexes of N283 sulfamoyloxazolidinones with β -cyclodextrin: a molecular modeling approach. **Chemical Physics Letter**, v. 595-596, p. 113-120, 2014.

DINIZ, K. M.; TARLEY, C. R. T. Speciation analysis of chromium in water samples through sequential combination of dispersive magnetic solid phase extraction using mesoporous amino-functionalized Fe₃O₄/SiO₂ nanoparticles and cloud point extraction. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 185-195, 2015.

DUAN, M. S. *et al.* Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: formation of aggregates and higher-order complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, n. 1-2, p. 213-222, 2005.

DUARTE JÚNIOR, A. P. **Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo dexametasona para tratamento tópico de inflamações cutâneas**. 2016. Tese (Programa de Pós graduação em Nanotecnologia Farmacêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

EC. EUROPEAN COMMISSION'S SCIENCE AND KNOWLEDGE SERVICE. **Official Journal of the European Union**: Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. 2011. Disponível em: <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/nanotechnology>. Acesso em: 13 Jun 2018.

ENSIGN, L. M. *et al.* Mucus penetrating nanoparticles: biophysical tool and method of drug and gene delivery. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3887-3894, 2012.

ERMER, J.; LANDY, J. S. Validation of analytical procedures. *In*: MARCEL-DEKKER, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. v. 1, 2002. p. 1-22.

EYONG, K. O.; KUETH, V.; EFFERTH, T. Quinones and benzophenones from the medicinal plants of Africa. **Medicinal Plant Research in Africa**, p. 352-391, 2013.

FALCONER, R. J.; COLLINS, B. N. Survey of the year 2009: applications of isothermaltitration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n. 1, p. 1-16, 2011.

FANG, J. Y. *et al.* Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, 101-109, 2006.

FANG, X. *et al.* Genomics grand for diversified plantsecondary metabolites. **Plant Diversity and Resources**, v. 33, n. 1, p. 53-64, 2011.

FATHI, M.; MARTIN, A.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends and Food Scice & Technology**, v. 39, n. 1, p.18-39, 2014.

FATTAHI, M.; RAHIMI, R. Optimization of Extraction Parameters of Phenolic Antioxidants from Leaves of Capparis spinosa Using Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 8, 2321-2334, 2016.

FAVARO-TRINDADE, C. S. *et al.* The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 336-40, 2010.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry**: Contains Nonbinding Recommendations. United States, 2015.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA. **Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials**: Guidance for Industry. United States, 2017.

FENYVESI, E. *et al.* Biodegradation of cyclodextrins in soil. **Chemosphere**, v. 60, p. 1001-1008, 2005.

FERREIRA, M. A. D. *et al.* Inhibition of platelet activation by quinones isolated from *Auxemma oncocalyx* Taub. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 106, n. 1-2, p. 97-107, 1999.

FERREIRA, M. A. D. *et al.* Antioxidant activity of quinones isolated from *Auxemma oncocalyx* Taub. In: Proceedings of the 6th Pharmatech; 3th Annual Meeting of the SBTF; APGI Symposium on Membrane Transport; 3th Meeting of Pharmaceutical Quality Control-ENECQ, 2001, Recife, Brazil, 2001. **Anais [...]**. Recife, 2001.

FERREIRA, M. A. D. *et al.* Antioxidant effects in the quinone fraction from *Auxemma oncocalyx* TAUB. **Biological and Pharmacetical Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 595-599, 2003.

FERREIRA, M. A. D. *et al.* Analgesic and anti inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx* .**Phytomedicine**, v. 11, p. 315-322, 2004.

FERREIRA, M. A. D. *et al.* Oncocalyxone A inhibits human platelet aggregation by increasing cGMP and by binding to GP Iba glycoprotein. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p.1216-1224, 2008.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 163-169, 2017.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4,1989.

FOLCH-CANO, C.; YAZDANI-PEDRA, M.; OLEA-AZAR, C. Inclusion and Functionalization of Polymers with Cyclodextrins: Current Applications and Future Prospects. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14066-14079, 2014.

FONTENELE, J. B.; SOUSA, D. C. Efeitos de *Hymenaea courbaril* Linn., *Auxemma oncocalyx* Taub., *Torresea cearenses* Fr. All. e *Jatropha gossypifolia* Linn. sobre a agregação plaquetária. In: ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, 11, 1992, Fortaleza. **Anais [...]**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1992. p 128.

FUKUDA, M. *et al.* Influence of sulfobutyl ether betacyclodextrin (Captisol) on the dissolution properties of a poorly soluble drug from extrudates prepared by hot-melt extrusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 188-96, 2008.

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Quality Assurance in Analytical Chemistry**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2007.

GALVÉZ, P.; RUI, A.; CLARES, B. El futuro de la medicina clínica hacia nuevas terapias: terapia celular, génica y nanomedicina. **Medicina Clinica**, v. 137, n. 14, p. 645-649, 2011.

GENTILE, P. *et al.* Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan–gelatina scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. **Materials Science & Engineering C**, v. 59, n.1, p. 249-257, 2016.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GHAIA, R.; FALCONER, R. J.; COLLINS, B. M. Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research-survey of the literature from 2010. **Journal of Molar Recognition**, v. 25, p. 32-52, 2011.

GIDWANI, B.; VYAS, A. Synthesis, characterization and application of epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, n. 1, p. 130-137, 2014.

GOMEZ-BIAGI, R. F.; JAGT, R. B. C.; NITZ, M. Remarkably stable inclusion complexes with heptakis-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- β -cyclodextrin. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 4622-4626, 2008.

GOTTSCHLING, M. C; MILLER, J. S. Clarification of the taxonomic position of *Auxemma*, *Patagonula* and *Saccellium* (Cordiaceae, Boraginales). **Systematic Botany**, v. 31, n. 2, p. 361-367, 2006.

GOUVEA, D. R. *et al.* Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* less (*Asteraceae: Vernonieae*) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012.

GRAF, R. *et al.* Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v. 263, n. 1600-1603, 1994.

GROLIER, J-P. E.; DEL RÍO, J. M. Isothermal titration calorimetry: A thermodynamic interpretation of measurements. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 55, p. 193-202, 2012.

GUEDES, F. L. *et al.* Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 220-225, 2008.

GUIMARÃES, I. F.; COELHO, M. F. B.; AZEVEDO, R. A. B. Pau branco (*Cordia oncocalix* Allemão) - Boraginaceae: Árvore endêmica da Caatinga. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n.5, p. 31-39, 2013.

GUO, H. *et al.* Development and validation of a HPLC-UV-ESI-MS method for the simultaneous quantitation of ten bioactive compounds in Dahuang Fuzi Tang. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 12, p. 952-960, 2014.

HASHEMI, B.; SHAMSIPUR, M.; BARATI, A. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop with Central Composite Design for the

Determination of Nitrophenols Using High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2046-2053, 2015.

HEIDARIZADI, E.; TABARAKI, R. Simultaneous spectrophotometric determination of synthetic dyes in food samples after cloud point extraction using multiple response optimizations. **Talanta**, v. 148, n. 1, p.237-246, 2016.

HEYDEN, Y. V. *et al.* Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceuticals and Biomedicals Analyses**, v. 24, n.5-6 p.723-753, 2001.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v.4, p. 117-122, 1965.

HIRLEKAR, R.; KADAM, V. Preformulation study of the inclusion complex Irbesartan- β -Cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n.1, p. 276-281, 2009.

HIRAYAMA, F.; YAMAMOTO, M.; UEKAMA, K. Acid-catalyzed hydrolysis of maltosyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 81, n. 9, p. 913-916, 1992.

HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. Measurements of binding thermodynamics in drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, p. 1543-1550, 2005.

HUANG, R.; LAU, B. L. T. Biomolecule–nanoparticle interactions: Elucidation of then thermodynamics by isothermal titration calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, p. 945-956, 2016.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**, 2005.

IGNACZACK, A.; PALECZ, B.; BELICA-PACHA, S. Quantum chemical study and isothermal titration calorimetry of β -cyclodextrin complexes with mianserin in aqueous solution. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 1209-1216, 2017.

ILAYARAJA, S.; PRABAKARAN, K.; MANIVANNAN, R. Evaluation of Anti-Bacterial, Analgesic and Anti-Inflammatory activities of Oncocalyxone A isolated from *Prenanthes sarmentosus*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 10, p. 88-91, 2014.

INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis: Application for Drugs That Derived From Herbs. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 43, p. 359-392, 2018.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INOUE, Y. *et al.* Thermodynamics of molecular recognition by cyclodextrins. 1. Calorimetric titration of inclusion complexation of naphthalenesulfonates with α -, β -, and γ -cyclodextrins: enthalpy-entropy compensation. **Journal of American Chemical Society**, v. 115, n. 2, p. 475-481, 1993.

IQBAL, M. *et al.* Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, p. 173-190, 2015.

IRENE, M.; KONSTANTINA, Y. Anionic cyclodextrins as versatile hosts for pharmaceutical nanotechnology: Synthesis, drug delivery, enantioselectivity, contrast agents for MRI. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1-2, 275-290, 2015.

ISAILOVIC, B. D. *et al.* Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. **Innovate Food Science & Emerging Technology**, v. 19, p. 181-189, 2013.

IUPAC. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 1699, 1995.

JAGER, E. *et al.* Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

JBEYLI, M.; KREESLER, J. Fluorophilicity and lipophilicity of fluorinated rhodamines determined by their partition coefficients in biphasic solvent systems. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 193, p. 67-72, 2017.

JEMMALI, Z. *et al.* Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography-mass spectrometry analysis in plant extracts. **Talanta**, v. 147, n. 15, p. 35-43, 2016.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1998.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 417-27, 2014.

JOSH, B. D. *et al.* Study of molecular structure, vibrational, electronic and NMR spectra of oncolyxone A using DFT and quantum chemical calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 113, p. 367-377, 2013.

JUDSON, L. H. *et al.* Cationic β -cyclodextrin derivative for chiral separations. **Journal of Chromatography A**, v. 803, n. 1-2, p. 261-271, 1998.

KANG, B-S. *et al.* Enhancing the in vitro anticancer activity of albendazole incorporated into chitosan-coated PLGA nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 39-47, 2017.

KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, n. 1, p. 131-139, 2014.

KARCHER, B. D. *et al.* A 21st Century HPLC Workflow for Process R&D. **Journal of the Association Laboratory Automation**, v. 10, p. 381-393, 2005.

KERNS, E.; DI, L. **Druglike Properties: Concepts, Structure Design and Methods**. Amsterdam: Academic Press, 2008.

KHANAL, S. *et al.* pH-Responsive PLGA Nanoparticle for Controlled Payload Delivery of Diclofenac Sodium. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 7, n.3, p. 3-12, 2016.

KIM, P. S.; DJAZAYERI, S.; ZEINELDIN, R. Novel nanotechnology approaches to diagnosis and therapy of ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 120, n. 3, p. 393-403, 2011.

KIRILOV, P. *et al.* A new type of colloidal dispersions based on nanoparticles of gelled oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 328, n. 1-3, p. 1-7, 2008.

KIRSCH, K.; HANKE, U.; WEITSCHIES, W. An overview of intestinal wafers for oral drug delivery. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 114, p. 2017, 135-144, 2017.

KO, P. T. *et al.* Polymer microneedles fabricated from PCL and PCL/PEG blends for transdermal delivery of hydrophilic compounds. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 24, p. 15-24, 2015.

KOHR, N. J. *et al.* Drug Delivery Systems and Controlled Release. **Encyclopedia of Biomedical Engineering**, p. 316-329, 2019.

KOTILAINEN, T. *et al.* Seasonal fluctuations in leaf phenolic composition under UV manipulations reflect contrasting strategies of alder and birch trees. **Physiologia Plantarum**, v. 140, n. 4, p. 297-309, 2010.

KOTZE, A. F. *et al.* Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). **Journal of Controlled Release**, v. 51, n. 35-46, 1998.

KROMIDAS, S. **Validierung in der Analytik**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

LAMPRECHT, A. *et al.* Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. **Nanotechnology**, v. 17, n. 15, p. 3673-80, 2006.

LARBAT, R. *et al.* Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato. **Phytochem**, v. 77, p. 119-128, 2012.

LEMOS, T. L. G. *et al.* Benzoquinonas, hidroquinonas e sesquiterpenos de *Auxemma glazioviana*. **Quimica Nova**, v. 28, n. 4, p. 591-595, 2005.

LEVYA, A. *et al.* Oncocalyxones A and C, 1,4-anthracenediones from *Auxemma oncocalyx*: comparison with anticancer 1,9-anthracenediones. **Anticancer Research**, v. 20, p. 1029-1032, 2000.

LIN, H. Y. *et al.* Novel nanoparticles for oral insulin delivery via the paracellular pathway. **Nanotechnology**, v. 18, p.1-11, 2007.

LINO, C. S. *et al.* Estudo da atividade analgésica e antiedematogênica do extrato hidroalcoólico de *Auxemma onocalyx* e *onocalyxona A*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. **Anais [...]**. Florianópolis, 1996. p. 95.

LIU, L.; GUO, Q. X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 42, p. 1-14, 2002.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1607-1621, 2010.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1-2, p. 15-30, 2001.

LOFTSSON, T.; MASSON, M.; BREWSTER, M. E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 5, p. 1091-1099, 2004.

LOPÉZ-NICOLÁS, J. M. *et al.* Physicochemical and thermodynamic characterization of the encapsulation of methyl jasmonate by natural and modified cyclodextrins using reversed-phase high-pressure liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 47, p. 11347-11354, 2013.

LULA, I. *et al.* Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its beta-cyclodextrin inclusion complexes: complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. **Peptides**, v. 28, n. 11, p. 2199-2210, 2007.

LUNA, E. A. *et al.* Characterization of Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrin Mixtures. In: Szejtli, J., Szenté, L., (eds). **Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins**, p. 133-136, 1996.

MAGNUSDOTTIR, A.; MASSON, M.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 44, n. 1-4, p. 213-218, 2002.

MAGNUSSON; ORNEMARK, U. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2. ed. 2014.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n. 1377-1397, 2011.

MALTA, L. F. B. *et al.* Recognition mechanism of D- and L-tryptophan enantiomers using 2-hydroxypropyl- α - or β -cyclodextrins as chiral selectors. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 1182-1188, 2008.

MANOSROI, J. *et al.* Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- β - cyclodextrin.

International journal of pharmaceutics, v. 293, n. 1-2, p. 235-240, 2005.

MARKMAN, G.; LIVNEY, Y. D. Maillard-conjugate based core-shell co-assemblies for nanoencapsulation of hydrophobic nutraceuticals in clear beverages. **Food & Function**, v. 3, p. 262-70, 2012.

MARQUES, W. B. *et al.* Anthracene derivatives from *Auxemma oncocalyx*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 793-797, 2000.

MARTÍNEZ, G. *et al.* Formation of crystalline inclusion compounds of poly (vinyl chloride) of different stereoregularity with γ - cyclodextrin. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2503-2513, 2007.

MARTINS, C. B. M. *et al.* *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 115-122, 2010.

MASWAL, M.,; DAR, A. A. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 37:182–95, 2014.

MATIAS, E. F. F. *et al.* Atividade antibacteriana in vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010a.

MATIAS, E. F. F. *et al.* Light-enhanced antibiotic activity of Brazilian medical plants (*Croton campestris* A, *Ocimumgratissimum* L and *Cordia verbenaceae* DC). **Asian Biomed**, v. 4, n. 1, p. 183-186, 2010b.

MATOS, T. S. *et al.* Neuroinhibitory meroterpenoid compounds from *Cordia oncocalyx*. **Fitoterapia**, v. 123, p. 65-72, 2017.

MAYTI, B. *et al.* Deciphering the perturbation effect of urea on the supramolecular host-guest interaction of biologically active hydrophobic molecule inside the nanocavity of cyclodextrins. **Journal of Luminescence**, v. 183, p. 238-250, 2016.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 232–249, 2011.

MAZZAFERRO, S. *et al.* Bivalent sequential binding of docetaxel to methyl-bcyclodextrin. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 413, n. 1, p. 171-180, 2011.

MAZZARINO, L. *et al.* Mucoadhesive Films Containing Chitosan-Coated Nanoparticles: A New Strategy for Buccal Curcumin Release. **Pharmaceutical Nanotechnology**. v. 103, p. 3764-3771, 2014.

MCBAIN, S. C.; YIU, H. H.; DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 169, 2008.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 235-45, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. **Annual Reviews Food Science Technology**, v. 1, p. 241-69, 2010.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 27-53, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active components**. Boca Raton, FL: CRC Press; 2014.

MCNAIR, H., POLITE, L. N. 17 Troubleshooting in high performance liquid chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 8, p. 459-477, 2017.

MCNEIL, S. E. Nanoparticle therapeutics: a personal perspective. Wiley **Interdisciplinary Reviews Nanomedicine Nanobiotechnology**, v. 1, n. 13, p. 264-271, 2009.

MENNINI, N. *et al.* Quality by design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-PVP complex. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 67-75, 2012.

MICHELETTI, A. C. *et al.* Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & adler – Isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibióticas e citotóxica. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 12-20, 2009.

MOEIN, M. M.; EL BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B**, v. 043, p. 3-11, 2017.

MOHAN, A. *et al.* Constrained/Directed Crystallization of Nylon-6. I. Nonstoichiometric Inclusion Compounds Formed with Cyclodextrins. **Macromolecules**, v. 42, n. 22, p. 8983-8991, 2009.

MORAIS, R. C. J. **Nos verdes campos da ciência: a trajetória acadêmica do médico e botânico brasileiro Francisco Freire-Allemão (1797-1874)**. 2005. Dissertação (Mestrado em História das Ciências da Saúde) – Casa de Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

MORIN-CRINI, N. *et al.* Water-insoluble β -cyclodextrin–epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: A review of inclusion mechanisms. **Progress in Polymer Science**, v. 78, p. 1-23, 2018.

MOSHER, G.; THOMPSON, D. O. Complexation and cyclodextrins. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, p. 531-558, 2002.

MUDSHINGE, S.R. *et al.* Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 3, p. 129–141, 2011.

MUN, S.; RHO, SHIN-JOUNG.; KIM, R. R. Study of inclusion complexes of cycloamylose with surfactants by isothermal titration calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 223–230, 2009.

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

NAGHILOO, S. *et al.* Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots: leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). **BioImpacts**, v. 2, n. 2, p. 105–109, 2012.

NARAYANAN, G. *et al.* Analytical techniques for characterizing cyclodextrins and their inclusion complexes with large and small molecular weight guest molecules. **Polymer Testing**, v. 62, p. 402–439, 2017.

NARAYANAN, G.; GUPTA, B. S.; TONELLI, A. E. Enhanced mechanical properties of poly (ϵ -caprolactone) nanofibers produced by the addition of non-stoichiometric inclusion complexes of poly (ϵ -caprolactone) and α -cyclodextrin. **Polymer**, v. 76, p. 321–330, 2015.

NEACSU, A. Physicochemical investigation of the complexation between γ -cyclodextrin and doxorubicin in solution and in solid state. **Thermochimica Acta**, v. 661, n. 10, p. 51–58, 2018.

NEKKANTI, V. *et al.* Comparative evaluation of proliposomes and self micro-emulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of nisoldipine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, p. 79–88, 2016.

NICOLAOS, G. *et al.* Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 263, n. 1–2, p. 165–171, 2003.

NOËL, S. *et al.* cyclodextrin-based systems for the stabilization of metallic(0)nanoparticles and their versatile applications in catalysis. **Cat. Tod.**, v. 235, p. 20–32, 2014.

OKIMOTO, K. *et al.* The interaction of charged and uncharged drugs with neutral hydroxypropyl- β -cyclodextrin and anionically charged sulfobutylether- β -cyclodextrins. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 2, p. 256–264, 1996.

OKSMAN-CALDENTEY, K. M.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433–440, 2004.

PARODI, B. *et al.* ON-line solid phase extraction of bismuth by FIHG-AAS using L-proline immobilised on carbon nanotubes combined with factorial design. **Microchemical Journal**, v. 122, p. 70–75, 2015.

PASSOS, J. J. *et al.* In vivo evaluation of the highly soluble oral β -cyclodextrin-Sertraline supramolecular complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 478-485, 2012.

PASSOS, J. J. *et al.* **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 345-351, 2013.

PATHAK, C.; VAIDYA, F. U.; PANDEY, S. M. Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System. **Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems**, p. 35-67, 2019.

PAULA, E. E. E. *et al.* Insights into the multi-equilibrium, superstructure system based on β -cyclodextrin and a highly water-soluble guest. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 207-215, 2012.

PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SACPOZZA, L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 24, n. 1-2, p. 1-52, 2004.

PESSOA, C. *et al.* Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Lead Molecules from Natural Products**, v. 2, p. 197-211, 2006.

PESSOA, C. *et al.* Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil. **Phytother Research**, v. 14, p. 187-191, 2000.

PESSOA, C. *et al.* Avaliação da atividade antitumoral de *Auxemma oncocalyx* Taub. (Pau Branco). In: VII REUNIÃO DA FESBE, 7, Caxambu. **Anais [...]**. Caxambu, 1992. p. 168.

PESSOA, C. *et al.* Cytotoxicity of derivatives of oncocalyxone A from *Auxemma oncocalyx* Taub. **Arkivoc**, v. 6, p. 89- 94, 2004.

PESSOA, C. *et al.* Oncocalixona A from *Auxemma oncocalyx* lacks genotoxic activity in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement**, v. 1, p. 215–220, 2003.

PESSOA, O. D. L. *et al.* Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1777-1786, 1995.

PESSOA, O. D. L. *et al.* Novel cordiachromes isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Natural Product Letters**, v. 2, n. 2, p. 145-150, 1993.

PIERPOINT, W. S. Salicylic acid and its derivatives in plants: Medicines, metabolites and messenger molecules. **Advances in Botanical Research**, v. 20, p. 163-235, 1994.

PINHO, E. *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 30, p. 121-135, 2014.

PUNITHA, S.; GIRISH, Y. Polymers in mucoadhesive buccal drug delivery system: A review. **International Journal of Research Pharmaceutics Science**, v. 1, p. 170-86, 2010.

- QIU, N. *et al.* Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and in vitro evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 30, p. 623-30, 2014.
- RADU, C.; PARTENI, O.; OCHIUZ, L. Application of cyclodextrins in medical textiles-review. **Journal of Controlled Release**, v. 224, n. 28, p. 146-157, 2016.
- RAKIC, T. *et al.* Comparison of full factorial design, central composite design, and Box-Behnken design in chromatographic method development for the determination of fluconazole and its impurities. **Analytical Letters**, v. 47, n. 8, p. 1334-1347, 2014.
- RAMA, A. C. R. *et al.* Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 59-68, 2006.
- RAMADAS, M. *et al.* Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: Intestinal delivery in diabetic rats. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 4, p. 405-11, 2000.
- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR G, A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.
- REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Complexation and chiral recognition thermodynamics of 6-amino-6-deoxy- β -cyclodextrin with anionic, cationic, and neutral chiral guests: counterbalance between van der Waals and coulombic interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 5, p. 813-826, 2002.
- REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Microcalorimetry. In: DODZIUK, H. (Ed.). **Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 215-222.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em Métodos Cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, A. *et al.* Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1102-1109, 2008a.
- RIBEIRO, F. A. D. L. *et al.* Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008b.
- RIBEIRO-COSTA, R. M. *et al.* In vitro and In vivo properties of Usnic Acid encapsulated into PLGA-Microsphere. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 4, p. 371-384, 2004.
- RIBOLDI, J. *et al.* Precisão e poder de testes de homocedasticidade paramétricos e não-paramétricos avaliados por simulação. **Revista Brasileira de Biomedicina**, v. 32, n. 3, p. 334-344, 2014.

RODRIGUES, K. L. T. *et al.* Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 242-249, 2014.

SÁ-BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: importante excipiente farmacêutico funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 629-36, 2008.

SAHU, P. K. *et al.* An Overview of Experimental Designs in HPLC Method Development and Validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, p. 30374-30376, 2018.

SAJEESH, S. *et al.* Cyclodextrin complexed insulin encapsulated hydrogel microparticles: an oral delivery system for insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 3, p. 377-384, 2010.

SAKATA, S. *et al.* Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 733-737, 2007.

SALÚSTIO, P. J. *et al.* Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 4, p. 1276-1292.

SANNA, V. *et al.* Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 531-536, 2015.

SANTOS, D. T. *et al.* Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. **Food Research International**, v. 50, n.2, p. 617-24, 2013.

SANTOS, L. *et al.* Multivariate Optimization of a Simultaneous Cloud Point Extraction Procedure of Cd, Cu and Ni from Sediments Samples and Determination by ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 4, 745-752, 2016.

SAYAR, O. *et al.* Optimization of Solid-phase Extraction by Experimental Design Methodology for Determination of Lead Ions Using Graphene Modified Nano-sheets as a Novel Sorbent. **Current Analytical Chemistry**, v.10, n. 4, p. 512-521, 2014.

SCHLIECKER, G. *et al.* Characterization of a homologous series of D,L-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. **Biomaterials**, v. 24, p. 3835-3844, 2003.

SCHNEIDER, H. J. *et al.* NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1755-86, 1998.

SEGURA-SANCHEZ, F. *et al.* Elucidation of the complexation mechanism between (1)-usnic acid and cyclodextrins studied by isothermal titration calorimetry and phase-solubility diagram experiments. **Journal of Molecular Recognition**, v. 22, p. 232-241, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the U.S. Food and Drug Administration, the U.S. Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHAFIQ, S. *et al.* Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 227-243, 2007.

SHAN, W. *et al.* Overcoming the diffusion barrier of mucus and absorption barrier of epithelium by self-assembled nanoparticles for oral delivery of insulin. **ACS Nano**, v. 9, n. 3, p. 2345-2356, 2015.

SHARAPOVA, A. *et al.* PHYSICO-chemical characterization antituberculosis thioacetazone: Vapor pressure, solubility and lipophilicity. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 108, p. 18-25, 2017.

SHEETS, G. **Lot release, analytics, and analytical validation.** Fundamentals of Biologicals Regulation: Vaccines nad Biotechnology Medicines, 2018.

SILKDER, T. *et al.* Remediation of water pollution with native cyclodextrins and modified cyclodextrins: A comparative overview and perspectives. **Chemical Engineering Journal**, 2019.

SILVA, M. A. P.; MACHADO, I. C. S. Biologia da reprodução e morfologia polínica de *Auxemma* Miers (Boraginaceae). **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 68, n. 2, p. 73-88, 1997.

SILVEIRA, A. P. *et al.* Predação de frutos e germinação de sementes em *Auxemma onocalyx* (Allemão) Baill. e *Auxemma glazioviana* Taub.. In: Nogueira, R.M.C. *et al.* **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas.** Recife: MXM gráfica e editora, v. 1. 2005. p. 416-432.

SINGH, B.; KUMAR, R.; AHUJA, N. Optimizing Drug Delivery Systems Using Systematic “Design of Experiments.” Part I: Fundamental Aspects. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 1, p. 27-105, 2004.

SIVAGNANAN, I.; KALAIVANANAN, P.; RAJAMANICKAM, M. Anti-diabetic activity of onocalixone A isolated from *Prenathes sarmentosus*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 630-633, 2013.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 57, n.3, p. 1556-1568, 2005.

SOBRINHO, T. J. S. P. *et al.* Phenolic contente and antioxidant capacity of four *Cnidoscolum* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, p. 2310-2316, 2011.

SOUSA, F. B. *et al.* Photo-response behavior of electrospun nanofibers based on spiropyran-cyclodextrin modified polymer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 9910-9917, 2008.

SOUZA, S. O. *et al.* Simultaneous Determination of Thorium and Uranium in Mineral Fertilizers by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 4, p. 799-806, 2016.

SOUZA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fonte, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 1-10, 2016.

SUBRAMANIAN, A.; COUTINHO, A. S.; SILVA, L. B. Aplicação de método e técnica multivariados para previsão de variáveis termoambientais e perceptivas. **Produção**, v. 7, n. 1, p. 52-70, 2003.

SWERDLOW, J. **Nature's Medicine: Plants That Heal**. Washington: National Geographic Society, 2000.

SZEJTLI, J.; AKADÉMIAI, K. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. **Journal of Chromatography**, v. 253, p. 292, 1982.

SZETJLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1754, 1998.

TAKEUCHI, H. *et al.* Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p. 160-170, 2005.

TAO, S. L.; DESAI, T.A. Gastrointestinal patch systems for oral drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 13, p. 909-915, 2005.

TAVARES, C. A. *et al.* Validation of an HPLC–UV Method for Quantifying Oncocalyxone A in Different Media and Nanocapsules. **Chromatographia**, v. 82, p. 1-10, 2019.

TEOH, P. L. *et al.* Recent approaches in the development of encapsulated delivery systems for probiotics. **Food Biotechnology**, v. 25, n.1, p. 77-101, 2011.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins-enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 1, p. 1-104, 1997.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TING, Y. W. *et al.* Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. **Journal of Funct Foods**, v. 7, n. 112-28, 2014.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: an updated review. **Pharmaceutical Methods**, v. 1, n. 1, p. 25-38, 2010.

TROJER, M. A. *et al.* Encapsulation of actives for sustained release. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 41, p. 17727-41, 2013.

UEKAMA, K.; FUMITOSHI, H.; TETSUMI, I. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045-2076, 1998.

UEKAMA, K. Novel approach of cyclodextrin-based pharmaceutical formulation. **Yakugaku Zasshi**, v. 132, n. 1, p. 85-105, 2012.

UPADHYE, S. B. *et al.* Preparation and Characterization of Inclusion Complexes of a Hemisuccinate Ester Prodrug of 9-Tetrahydrocannabinol with Modified Beta-Cyclodextrins. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p.509-17, 2010.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIAL. **Convention USP Medicines Compendium, General Information, Assessing Validation Parameters for Reference and Acceptable Procedures**. Rockville, 2013.

UYAR, T. *et al.* Polymerization of styrene in γ -cyclodextrin channels: Lightly rotaxanated polystyrenes with altered stereosequences. **Polymer**, v. 47, n. 20, p. 6948-6955, 2006.

VEIGA, M. D.; AHSAN, F. Hydroxypropyl gamma cyclodextrin as a solubiliser and dissolution enhancing agent: the case of tolbutamide-A poorly water-soluble drug. proceedings of the ninth. **International Symposium on Cyclodextrins**, p. 321-324, 1999.

VELOSO, F. T. *et al.* 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**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2009.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plantsecondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 103-113, 2015.

VIANA, S. M. *et al.* *In vitro* and *In vivo* evaluation of quinones from *Auxemma Oncocalix* Taub. On *Leishmania Brasiliensis*. **Jornal of Medicinal Plant Research**, v. 9, n. 5, p. 132-139, 2015.

VIEIRA DE MELO, I. S. *et al.* Oncocalyxone a functions as an anti-glycation agent in vitro. **Plos One**, v. 25, p. 1-8, 2015.

WATTANASIN, P. *et al.* Zone fluidics for measurement of octanol–water partition coefficient of drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 860, n. 20, p. 1-7, 2014.

WENZ, G. *et al.* Recognition of ionic guests by ionic β -cyclodextrin derivatives. **Chemistry European Journal**, v. 14, p. 7202-7211, 2008.

WILCZEWSKA, A. Z. *et al.* Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020-1037, 2012.

WILLIAMSON, B. R. **Processing polymers with cyclodextrins**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências de Fibras e Polímeros) - Pós graduação em Ciências de Fibras e Polímeros, Universidade Estadual da Carolina do Norte, 2010.

WILLIAMSON, B. R.; TONELLI, A. E. Constrained polymer chain behavior observed in their nonstoichiometric cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, n. 1-2, p.71-78, 2011.

WINGERT, N. R. *et al.* Ultraperformance LC-ESI/Q-TOF MS for the Rapid Analysis of Rivaroxaban: Method Validation Using Experimental Design for Robustness Evaluation. **Current Analytical Chemistry**, v. 1, n. 2, p.124-129, 2015.

WITTAYA-AREEKUL, S. *et al.* Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 113–118, 2006.

WOLFENDER, J. LHPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

XAVIER-JÚNIOR, F. H. *et al.* Elucidation of the mechanism of complexation between onocalyxone A and cyclodextrins by isothermal titration calorimetry and molecular modeling. **Journal of Molecular Liquids**, v. 274, p. 165–172, 2019.

XAVIER-JÚNIOR, F. H. *et al.* HPLC method for the dosage of paclitaxel in copaiba oil: Development, validation, application to the determination of the solubility and partition coefficients. **Chromatographia**, v. 79, n. 7-8, p. 405-412, 2016.

XAVIER-JÚNIOR, F. H. *et al.* Supramolecular interactions between β -lapachone with cyclodextrins studied using isothermal titration calorimetry and molecular modeling. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, p. 2-10, 2017.

XU, L.; JIANG, Y.; QIU, R. Parametric study and global sensitivity analysis for co-pyrolysis of rape straw and waste tire via variance-based decomposition. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 545-552, 2018.

YAMAMOTO, M. *et al.* Some physicochemical properties of branched β -cyclodextrins and their inclusion characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 49, n. 2, p. 163-171, 1989.

YAO, M.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Delivery of lipophilic bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles. **Annual Review Food Science and Technology**, v. 5, n. 5, p. 53-81, 2014.

YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 32, n. 18, p. 243-259, 2005.

ZARRABI, A.; VOSSOUGH, M. Paclitaxel/ β -CD-g-PG inclusion complex: An insight into complexation thermodynamics and guest solubility. **Journal of Molecular Liquids**, v. 208, p. 145-150, 2015.

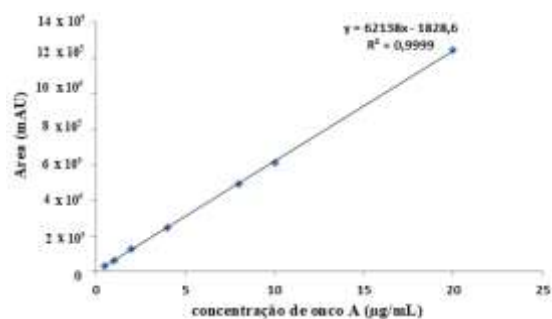
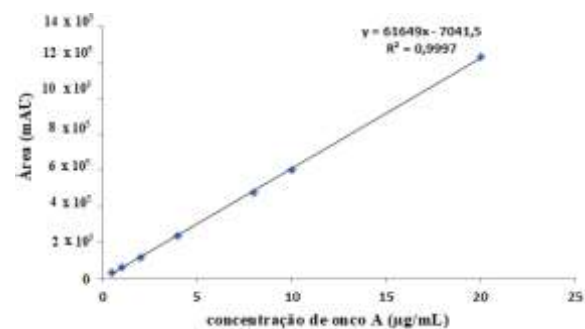
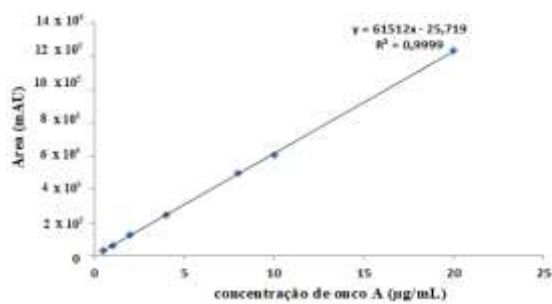
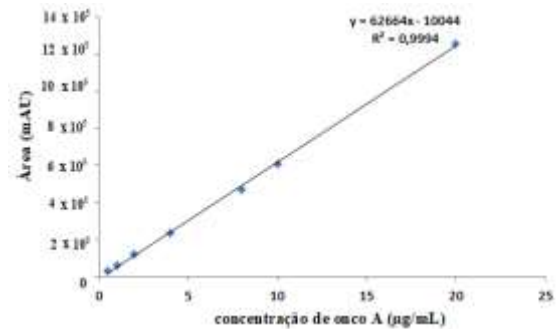
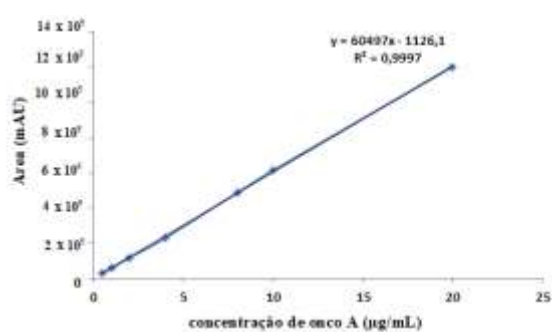
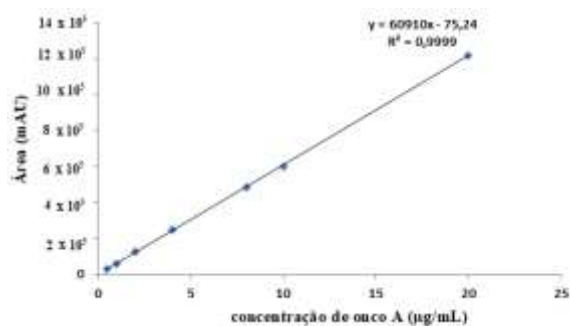
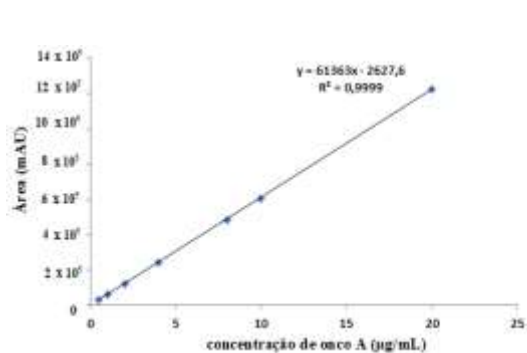
ZHANG, C. L. *et al.* Experimental and molecular docking investigations on the inclusion mechanism of the complex of phloridzin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 215, n. 15, p. 124-128, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 11-19, 2011.

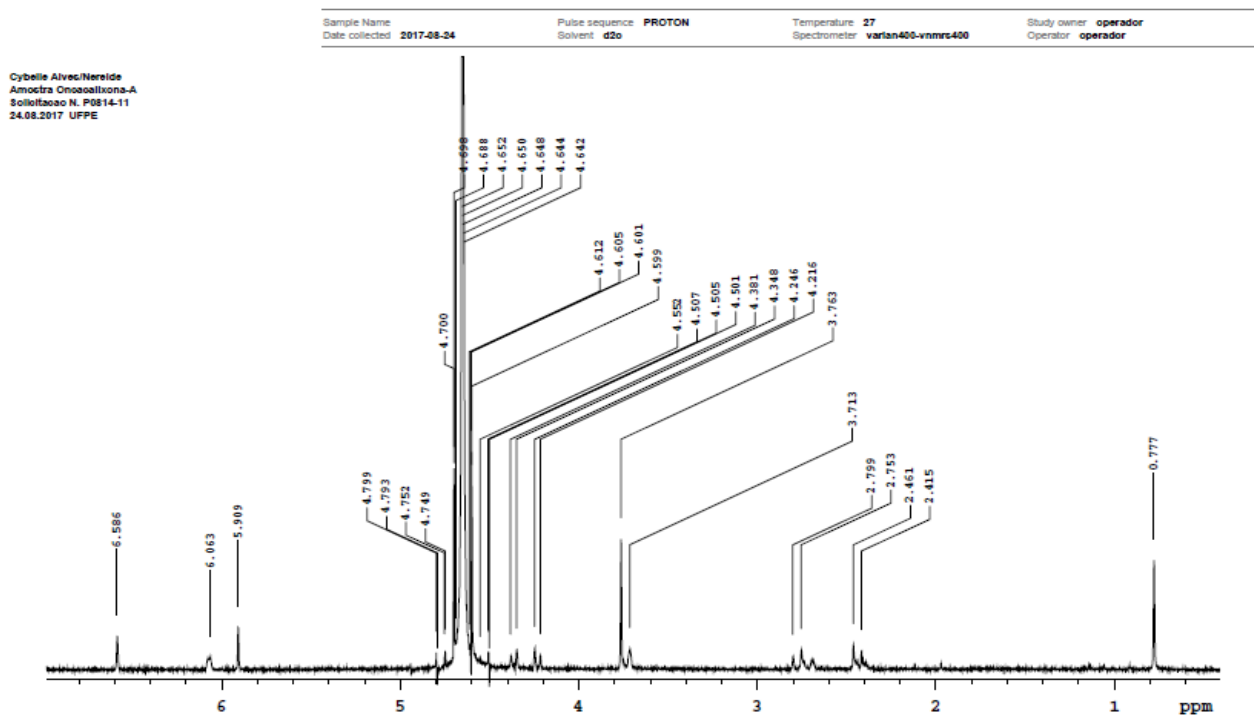
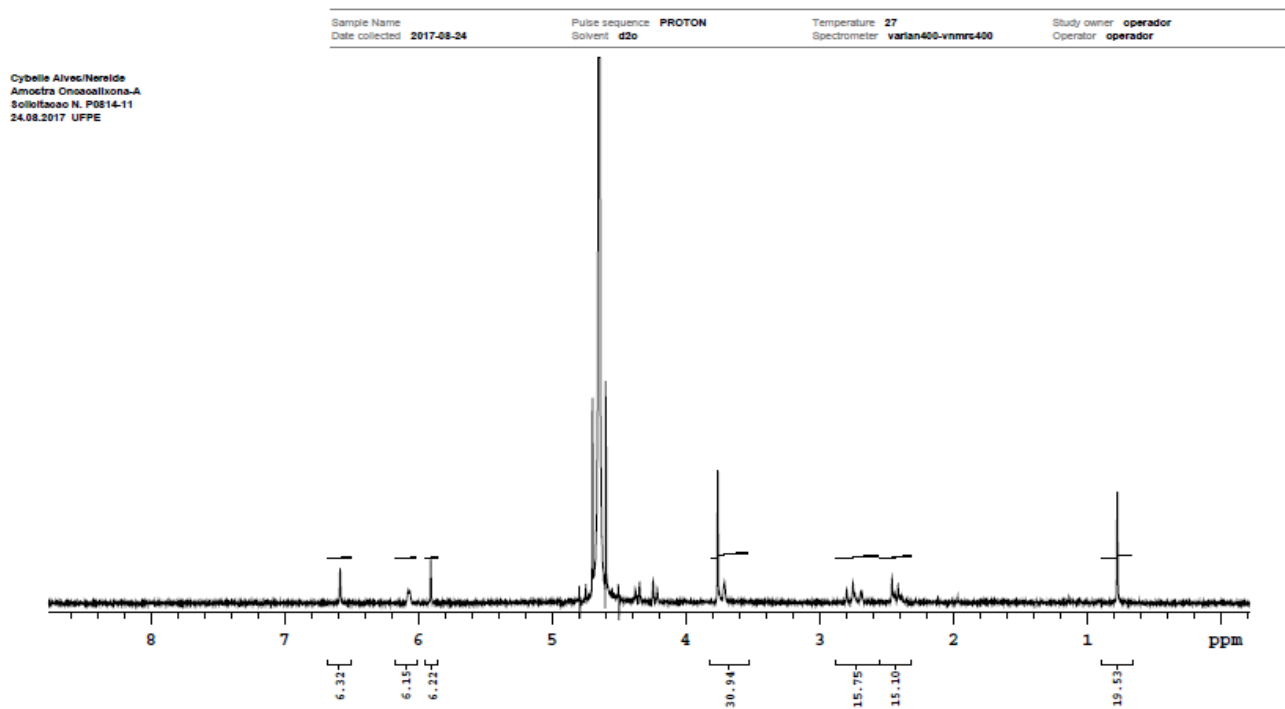
ZHENG, Y. *et al.* Effect of pH on the complexation of kaempferol-40'-glucoside with three β -cyclodextrin derivatives: Isothermal titration calorimetry and spectroscopy study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 244-250, 2014.

ZIA, V.; RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: Comparison of sulfobutylether- β -cyclodextrin to hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 5, p. 668-673, 2001.

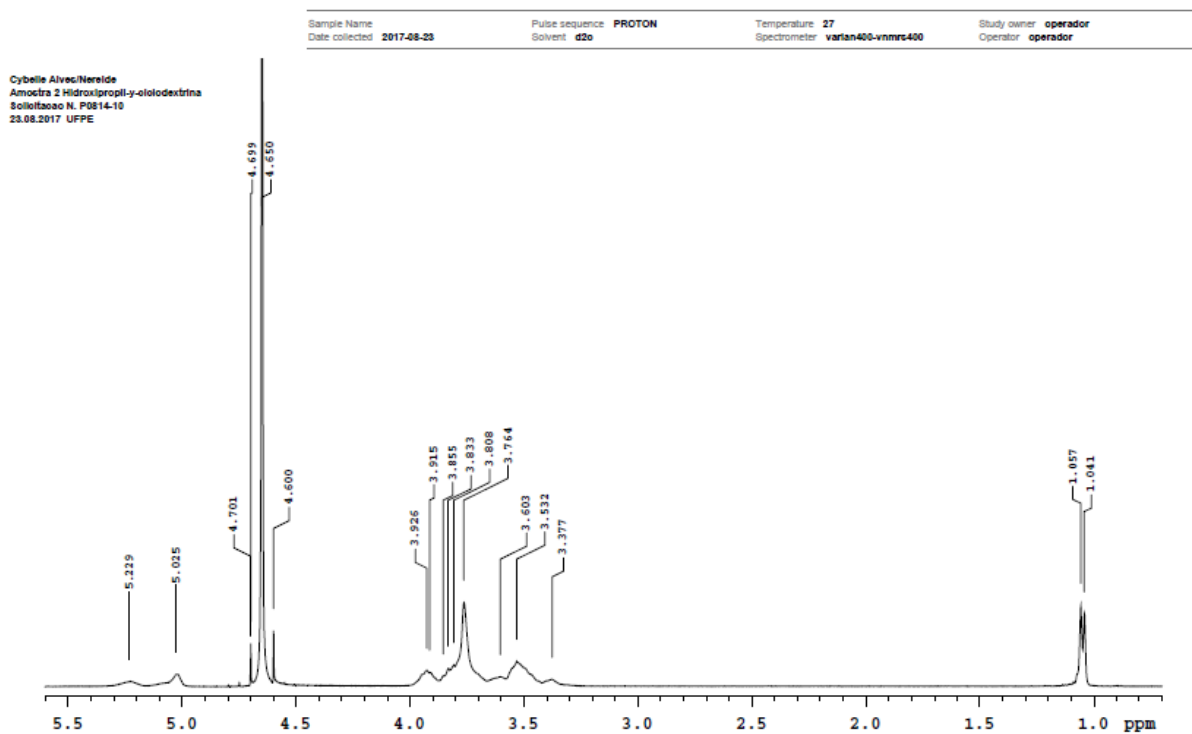
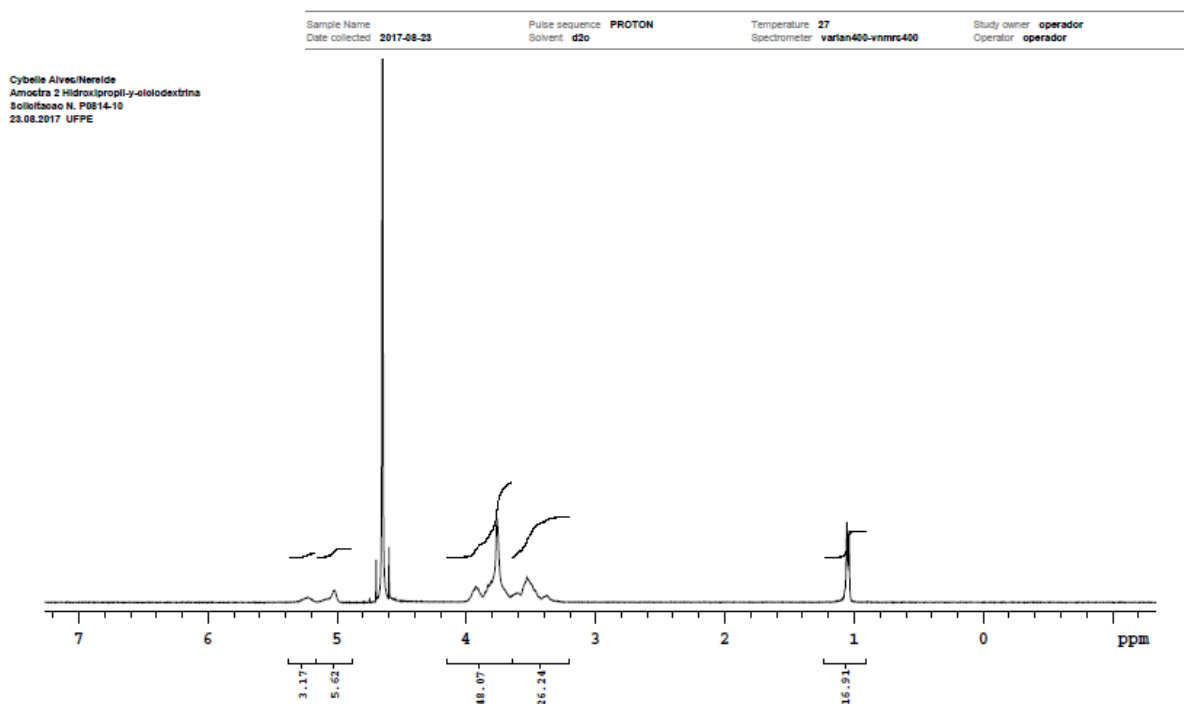
**APÊNDICE A - SETE CURVAS PADRÃO INDEPENDENTES COM
CONCENTRAÇÕES DE 0,5 A 20 MG.ML⁻¹ DE ONCO A**



APÊNDICE B - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DA ONCOCALIXONA A



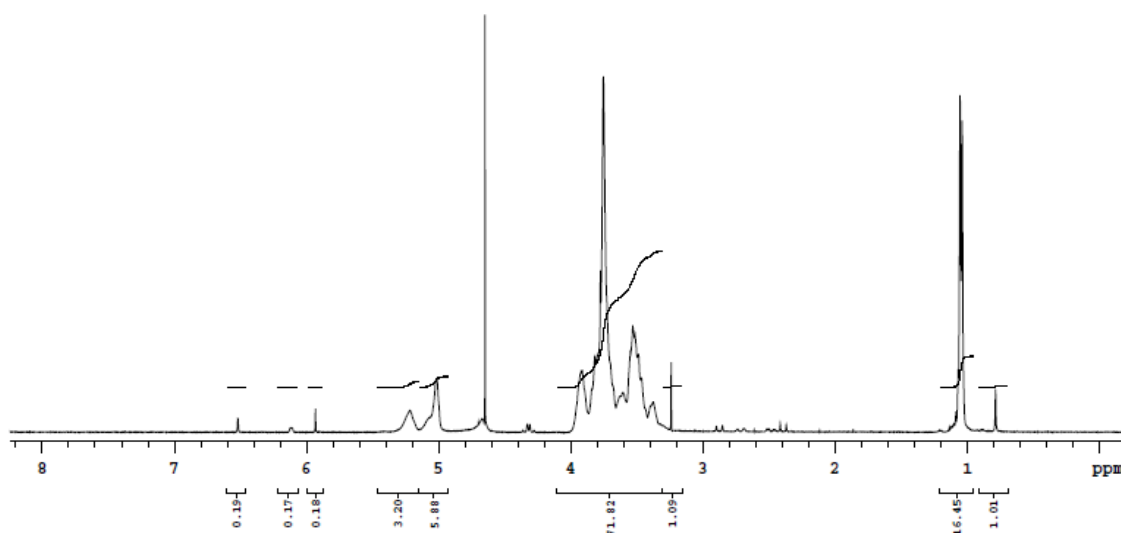
APÊNDICE C - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DA HP- Γ -CD



APÊNDICE D - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H DO COMPLEXO DE INCLUSÃO PNCO A: HP- Γ -CD

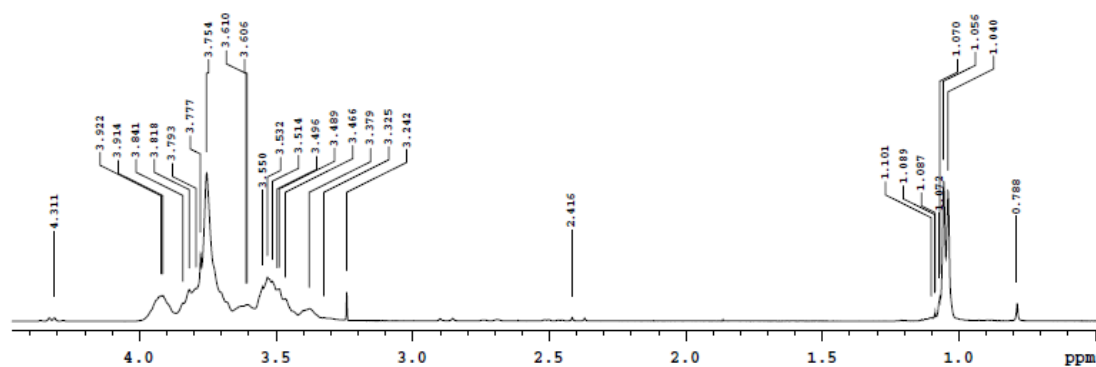
Sample Name	Pulse sequence	Temperature	Study owner
Date collected	Solvent	Spectrometer	Operator
2017-08-26	d2o	27 varian400-vnmrs400	operador operador

Cybele Alves/Nereide
Amostra Complexo OnoaA:HPyCD
Solioliacao N. P0814-12
24.08.2017 UFPE



Sample Name	Pulse sequence	Temperature	Study owner
Date collected	Solvent	Spectrometer	Operator
2017-08-26	d2o	27 varian400-vnmrs400	operador operador

Cybele Alves/Nereide
Amostra Complexo OnoaA:HPyCD
Solioliacao N. P0814-12
24.08.2017 UFPE



Sample Name	Pulse sequence	Temperature	Study owner
Date collected	Solvent	Spectrometer	Operator
2017-08-26	d2o	27 varian400-vnmrs400	operator operator

Cybelle Alves/Nereide
Amostra Complexo OnoaA:HPyCD
Solucao N. P0814-12
24.08.2017 UFPE

