



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

CYBELLY MARQUES DE MELO

**ESTUDO *in silico* e *in vitro* DO INCREMENTO DE SOLUBILIDADE DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPIISOPILOTURINA E CICLODEXTRINAS
COMO ALTERNATIVA INOVADORA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEGLIGENCIADAS**

Recife

2019

CYBELLY MARQUES DE MELO

**ESTUDO *in silico e in vitro* DO INCREMENTO DE SOLUBILIDADE
DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPIISOPILOTURINA E
CICLODEXTRINAS COMO ALTERNATIVA INOVADORA NO
TRATAMENTO DE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS**

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

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Araújo Rolim

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M528e Melo, Cybelly Marques de.
Estudo *in silico e in vitro* do incremento de solubilidade de complexos de inclusão epiisopiloturina e ciclodextrinas como alternativa inovadora no tratamento de doenças negligenciadas / Cybelly Marques de Melo. – 2019. 105 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Jaborandi. 2. Doenças negligenciadas. 3. Ciclodextrinas. 4. Epiisopiloturina. 5. Incremento de solubilidade. I. Rolim Neto, Pedro José. (Orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019-212)

CYBELLY MARQUES DE MELO

**ESTUDO *in silico e in vitro* DO INCREMENTO DE SOLUBILIDADE
DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPIISOPILOTURINA E
CICLODEXTRINAS COMO ALTERNATIVA INOVADORA NO
TRATAMENTO DE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS**

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

Aprovada em: 26/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Jose Rolim-Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco/DCFAR

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti Amorim (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco / DCFAR/UFPE

Prof. Dr. Marcelo Montenegro Rabello (Examinador externo)
Universidade Federal do Vale de São Francisco – UNIVASF

Dr^a Larissa Morgana dos Santos Mendes (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco/DCFAR

Dr. Paulo César Dantas da Silva (Examinador externo)
Universidade Estadual da Paraíba / UEPB

Aos meus maiores incentivadores:
José Marques, Maria Consuêlo e Cintya Marques.
Com amor!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais (**José Marques e Maria Consuêlo**) e minha irmã (**Cintya Marques**) pelo amor incondicional. Meu crescimento pessoal e profissional está diretamente atrelado ao apoio que recebo de vocês. Estes últimos anos foi um período muito difícil para nossa família, marcado por muita dificuldade, mas passamos por tudo de mãos dadas. O bonito da vida e a maior lição que fica é chegar ao fim de uma fase ruim e vê o quanto estamos mais fortes e unidos. A vocês dedico este trabalho e agradeço profundamente.!

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

A minha mais grata surpresa, meu cônjuge **Vando Santos**. Deus lhe colocou no meu caminho para arrancar do meu rosto os mais sinceros sorrisos. Obrigada pelo apoio e paciência.!

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

Ao meu professor, orientador e psicólogo nas horas vagas **Pedro Rolim** por tudo que já fez e ainda faz nesses meus anos de LTM.!! O senhor enxerga em mim um potencial que nem eu acredito ter as vezes. Não tenho palavras para agradecer todos os ensinamentos, as oportunidades que tive ao seu lado e por todo esse carinho que recebo. Serei eternamente grata por tudo!!! meu segundo pai, amigo e maior incentivador.!

A Prof^a Dr^a **Larissa Rolim** por todo carinho, apoio e contribuições durante a execução deste trabalho!

Agradeço especialmente a **Karolynne Rodrigues...** minha Isaurinha, meu braço direito. Este trabalho tem muito de você e sem sua ajuda não teria condições de fazer tanta coisa, Muito obrigada e sucesso na sua caminhada.!! À **Andrea Luciana**, mestranda, pela parceria nesses últimos anos de projeto e toda a contribuição para conclusão desse trabalho.

Ao LTM, por ser a minha segunda casa. Sem dúvida não se trata de um simples laboratório de pesquisa, formamos uma família...! Como já disse à muitos: EU NÃO VOU EMBORA! Agradeço em especial aos “isaurinhos” que em algum momento me ajudaram neste trabalho: **Rodrigo, Victor, Emersom, Camila**. Valeu povo bonito.!

Aos amigos que a vida acadêmica me deu. Gostaria de agradecer a **Paulo Dantas**, pela parceria, por toda ajuda no tratamento dos dados e pelos momentos divertidos.!! Pois na

dificuldade só nos resta rir (nem que seja de nervoso). A **Larissa Morgana** pelos bons momentos de convivência, a minha mana mais convicta e que não mede esforços para me ajudar.! Obrigada! **Marcos Gregório**, minha Poc inhaaaaa! Apenas por sua amizade, pelo abraço nas horas de dificuldade e o humor ácido que me fez chorar de rir por muitas vezes! Amo uma Poc.! e ao presente vindo direto da Bahêêê para o LTM/ minha vida, que tem até nome de música famosa. **Myla** coisa boa ter lhe conhecido! Sucesso nessa difícil jornada longe de casa e conte comigo sempre.!

E a todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, eu agradeço.!

De mim pode-se tirar tudo, menos meu conhecimento. (MELO, 2019).

RESUMO

A epiisopiloturina (EPI), um alcalóide extraído do resíduo de produção da pilocarpina, tem demonstrado promissora atividade anti-leishmaniose e esquistossomicida *in vitro* (doenças negligenciadas). Entretanto, por se tratar de uma molécula candidata à fármaco, suas características físico-químicas ainda são pouco esclarecidas. A literatura indica ainda que EPI apresenta baixa solubilidade aquosa, podendo repercutir diretamente na sua absorção e biodisponibilidade. Uma das alternativas tecnológicas para incrementar tal propriedade é a complexação com ciclodextrinas (CDs), polímero capaz de interagir com o fármaco hidrofóbico, aumentando a solubilidade. Assim, este trabalho tem como objetivo a caracterização físico-química e validação de metodologia de quantificação, realizar os estudos de modelagem molecular para elucidação *in silico* das interações entre EPI:CD (β CD e HP β CD) e incrementar o perfil de dissolução da EPI através da obtenção de complexos de inclusão por diferentes técnicas: liofilização (LIO), malaxagem (MAL) e nebulização (NEB). De acordo com as técnicas de caracterização utilizadas: a análise por Infravermelho e o perfil térmico da EPI obtido estão de acordo com a literatura. A microscopia eletrônica de varredura e Difração de Raios-X evidenciam o comportamento cristalino. A obtenção da cinética de degradação térmica pelo método isoconvencional de Flynn, Wall e Ozawa revelou que tal método foi aplicável para a determinação da Energia de ativação (E_a) da EPI para as frações de conversão de 40, 50, 60 e 70%, cujos R^2 obtidos foram iguais a 0,99, atingido maior valor de E_a em 10%, referente a 128 Kj/Mol. O perfil de dissolução foi avaliado em pH 6,8 e neste a EPI se mostrou fracamente solúvel ($\pm 33\%$ dissolvido em 15 min). O método por UPLC foi otimizado e validado de acordo com a RDC 166/2017. Por modelagem molecular a formação do complexo de inclusão EPI: HP β CD se mostrou mais estável, devido à quantidade de pontos de interação entre as moléculas. Os três complexos obtidos (LIO, MAL e NEB) foram caracterizados pelas mesmas técnicas e através dos ensaios de dissolução viu-se um incremento de solubilidade semelhante entre eles (91,31% CI_{MAL} ; 93,76% CI_{NEB} e 90,86% CI_{LIO} em 10 min). Dessa forma, os resultados obtidos foram satisfatórios aos objetivos propostos, pois as três técnicas utilizadas são viáveis podendo estas serem utilizadas, servindo de base para a obtenção de nova terapia voltada para doenças negligenciadas.

Palavras-chave: Jaborandi. Doenças negligenciadas. Ciclodextrinas. Epiisopiloturina. Incremento de Solubilidade.

ABSTRACT

Epiisopiloturin (EPI), an alkaloid extracted from pilocarpine production residue, has shown promising anti-leishmaniasis and schistosomicide activity in vitro (neglected diseases). However, because it is a drug candidate molecule, its physicochemical characteristics are still poorly understood. The literature also indicates that EPI has low aqueous solubility, a condition may directly impact its absorption and bioavailability. One of the technological alternatives to increase this property is the complexation with cyclodextrins (CDs), a polymer capable of interacting with the hydrophobic drug, increasing the solubility. Thus, this work aims at the physicochemical characterization and validation of the quantification methodology. molecular modeling studies for in silico elucidation of the interactions between EPI: CD (β CD and HP β CD) and increase the dissolution profile of EPI by obtaining inclusion complexes by different techniques: lyophilization (IOL), malaxation (MAL) and nebulization (NEB). According to the characterization techniques used: the infrared analysis and the thermal profile of the obtained EPI, confirming the identification. Scanning electron microscopy and X-ray diffraction show the crystalline behavior. Obtaining the thermal degradation kinetics by the Flynn, Wall and Ozawa isoconventional method revealed that such method was applicable for the determination of the EPI activation energy (E_a) for the 40, 50, 60 and 70% conversion fractions, whose R^2 obtained were equal to 0.99, reaching a higher E_a value of 10%, corresponding to 128 KJ / Mol. The dissolution profile was evaluated at pH 6.8 and in this case the EPI was poorly soluble (\pm 33% dissolved in 15 min). The UPLC assay method was optimized and validated according to RDC 166/2017. By molecular modeling the formation of the inclusion complex EPI: HP β CD was more stable, due to the amount of interaction points between the molecules. The three obtained complexes (IOL, MAL and NEB) were characterized by the same techniques, although the MAL shows signs of incomplete complexation (DCS, X-ray Diffraction) through dissolution assays a similar increase in solubility was observed between them. (91.31% CIMAL; 93.76% CINEB and 90.86% CILIO in 10 min) when compared to that of PPE alone. Thus, the results obtained were satisfactory to the proposed objectives, being of fundamental importance, since the three techniques used are viable for the formation of inclusion complexes, which can be used as a basis for obtaining new therapy for neglected diseases.

KeyWords: Jaborandi. Diseases neglected. Cyclodextrins. Epiisopiloturin. Solubility increment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagens do <i>Pilocarpus microphyllus</i> , o “jaborandi legítimo”.....	24
Figura 2-	Estrutura dos alcalóides encontrados no gênero <i>Pilocarpus</i>	26
Figura 3-	Estrutura da EPI, molécula mais abundante na biomassa gerada pela produção de Pilocarpina.....	27
Figura 4-	Formação de dextrinas cíclicas e acíclicas a partir do amido. a) amido b) dextrinas cíclicas e acíclicas.....	31
Figura 5-	a) Estrutura molecular geral das CDs b) estrutura das ciclodextrinas naturais.....	33
Figura 6-	Representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas.....	34
Figura 7-	Radicais mais utilizados nas substituições dos hidrogênios presentes nas hidroxilas das CDs.....	35
Figura 8-	Métodos de obtenção dos complexos de inclusão.....	36
Figura 9-	Esquema ilustrativo dos parâmetros de um teste de dissolução <i>in vitro</i>	43
Figura 10-	Espectro de absorção na região do infravermelho do protótipo EPI.....	59
Figura 11-	Imagem da EPI por microscopia Eletrônica de varredura, ampliada 5000x.....	60
Figura 12-	Difratograma da EPI.....	61
Figura 13-	Curva DSC da EPI, razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 100mL.min ⁻¹	62
Figura 14-	Curva TG, DTG e DTA da EPI, sob razão de aquecimento de 5°C.min ⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 100 mL.min ⁻¹	62
Figura 15-	Curvas TG da EPI em diferentes razões de aquecimento fluxo de nitrogênio de 100 mL.min ⁻¹	64
Figura 16-	Gráfico de FWO (a); gráfico E_a x fração de conversão (α) da EPI	65

Figura 17-	Perfil de dissolução da EPI em meio de pH 6,8.....	67
Figura 18-	Cromatograma da EPI.....	69
Figura 19-	Curva obtida a partir da média das amostras.....	70
Figura 20-	Cromatograma com os picos correspondentes à Pilocarpina e Epiisopiloturina.....	74
Figura 21-	Melhor solução de docking para o complexo EPI: β CD, visão frontal (A) e lateral (B).....	76
Figura 22-	Melhores soluções de docking para o complexo EPI:HP β CD nas orientações I (A) e II (B).....	77
Figura 23-	Diagrama de solubilidade de fases da EPI com HP β CD.....	79
Figura 24-	Espectro de IV-Vis das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CI _{LIO}), nebulizador (CI _{NEB}), malaxado (CI _{MAL}), mistura física (MF), EPI e HP β CD.....	81
Figura 25-	Fotomicrografias obtidas para a EPI (a), HB β CD (b), MF(c), CI _{LIO} (d), CI _{MAL} (e) e CI _{NEB} (f)	83
Figura 26-	Difratogramas das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CILIO), nebulizador (CINEB), malaxado (CIMAL), mistura física (MF), EPI e HP β CD.....	84
Figura 27-	Curvas de DSC das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CI _{LIO}), nebulizador (CI _{NEB}),malaxado (CI _{MAL}), mistura física (MF), sendo comparadas com as amostras de EPI e HP β CD isoladas.....	86
Figura 28-	Curvas de TG das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CI _{LIO}), nebulizador (CI _{NEB}), malaxado (CI _{MAL}), mistura física (MF), EPI e HP β CD.....	88
Figura 29-	Perfis de dissolução das amostras avaliados quanto ao percentual de EPI dissolvido.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Atividade esquistossomicida da EPI.....	29
Tabela 2-	Características físico-químicas das ciclodextrinas naturais.....	32
Tabela 3-	Exemplos atuais do uso da modelagem molecular na obtenção de complexos de inclusão com diferentes ciclodextrinas.....	38
Tabela 4-	Valores atribuídos as bandas mais expressivas do espectro da EPI e respectivos grupos funcionais.....	59
Tabela 5-	Valores obtidos a partir dos cálculos da cinética de degradação térmica, para os dois eventos térmicos da EPI.....	64
Tabela 6-	Relação entre os valores obtidos de Coeficiente de correlação linear e os valores de Energia de ativação para cada fração de conversão.....	65
Tabela 7-	Dados cromatográficos para a EPI frente a modificação na temperatura do forno e pH.....	69
Tabela 8-	Valores obtidos para cada curva de calibração, contendo o desvio médio entre cada concentração e o Desvio Relativo Padrão (DRP) em percentual.....	71
Tabela 9-	Características analíticas obtidas pelo método proposto.....	71
Tabela 10-	Valores de exatidão para os três níveis de concentrações.....	71
Tabela 11-	Resultados obtidos para repetibilidade.....	73
Tabela 12-	Valores referentes à precisão intermediária.....	73
Tabela 13-	Parâmetros avaliados na robustez do método analítico.....	75
Tabela 14-	Valores dos desvios relativos médios (%) das amostras analisadas, para cada condição modificada.....	75
Tabela 15-	Sumário das 10 melhores soluções de docking para o CI EPI:HP β CD nas orientações I e II.....	77
Tabela 16-	Constante de complexação (Kc 1:1) para o protótipo EPI mais HP β CD.....	80

Tabela 17-	Valores de T_{onsetF} para as amostras analisadas, com suas respectivas variações, em °C.....	87
Tabela 18-	Valores extraídos das Curvas de TG das amostras de complexo de inclusão (EPI: HPβCD) liofilizado (CI _{LIO}), nebulizador (CI _{NEB}) e malaxado (CI _{MAL}) e mistura física (MF).....	88
Tabela 19-	Valores obtidos a partir da dissolução das amostras analisadas.....	89
Tabela 20-	Valores obtidos de AUC para amostras analisadas.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância total atenuada
AUC	Área sobre a curva
CDs	Ciclodextrinas
CGT	Glicosiltransferase
CI	Complexo de inclusão
CI_{LIO}	Complexo de inclusão liofilizado
CI_{MAL}	Complexo de inclusão malaxado
CI_{NEB}	Complexo de inclusão nebulizador
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CM	Concentração média
CR	Concentração requerida
CV	Coefficiente de variância
DAD	Detectores de arranjo de diodos
DC	Doença de Crohn
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Doenças negligenciadas
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raio-x
DSC	Calorimetria exploratória Diferencial
DTG	Derivada da termogravimetria
E_a	Energia de ativação
EPI	Epiisopiloturina
FDA	Food and drug administration
FM	Fase móvel
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
FWO	Flynn-Wall-Ozawa
HP	Hidroxipropil
HPβCD	Hidroxi-propil- β -Ciclodextrina

ICDD	International Centre of Diffraction Data
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IV	Infravermelho
LIKA	Laboratório de imunopatologia Keizo Asami
LIO	Liofilização
MAL	Malaxagem
MD	Molecular docking
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
MM	Modelagem molecular
MO	Microscópio óptico
MS	Substituição molar
NEB	Nebulização
P&D	Produção e Desenvolvimento
PA	Princípio ativo
PILO	Pilocarpina
PZQ	Praziquantel
R²	Coefficiente de relação linear
RDC	Resolução de diretoria colegiada
RZ	Razão de aquecimento
SB	Sulfobutil
SBDD	Structure- based drug design
SQR	Substância química de referência
TG	Termogravimetria
TNBS	Trinitrobenzenosulfônico
TonsetF	Temperatura inicial de fusão
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UG	Unidade de glicose
UNIVASF	Universidade do Vale do São Francisco

USP	United States Pharmacopeia
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
αCD	alfa- ciclodextrina
βCD	beta-Ciclodextrina
γCD	Gama-ciclodextrina
ΔE	Variação de energia
ΔT_{onsetF}	Variação da temperatura inicial de fusão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	OBJETIVOS.....	23
1.1.1	Objetivo geral.....	23
1.1.2	Objetivo específicos.....	23
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1	EPIISOLOTURINA (EPI).....	24
2.1.1	Epiisopiloturina versus doenças negligenciadas.....	27
2.1.2	Outras atividades biológicas da EPI.....	29
2.2	CICLODEXTRINAS COMO ALTERNATIVA PARA O INCREMENTO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FÁRMACOS.....	30
2.2.1	Histórico e conceito das ciclodextrinas.....	31
2.2.2	Características das ciclodextrinas.....	32
2.2.3	Ciclodextrinas naturais X ciclodextrinas modificadas.....	34
2.2.4	Formação de complexos de inclusão.....	36
2.3	MODELAGEM MOLECULAR PARA ELUCIDAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE FÁRMACO:CICLODEXTRINA.....	37
2.4	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS	39
2.4.1	Espectrometria de absorção na região do infravermelho.....	40
2.4.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	40
2.4.3	Difração de raio-X.....	41
2.4.4	Análise térmica.....	42
2.4.5	Ensaio de dissolução in vitro.....	43
2.4.6	Métodos analítico de quantificação – importância da validação.....	46
2.4.6.1	Linearidade.....	46
2.4.6.2	Robustez.....	46
2.4.6.3	Seletividade.....	46
2.4.6.4	Precisão e exatidão.....	47

3	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA EPIISOPILOTURINA.....	48
3.1.1	Material.....	48
3.1.2	Métodos.....	48
3.1.2.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier ...	48
3.1.2.2	Microscopia eletrônica de varredura	48
3.1.2.3	Difração de raio-X.....	48
3.1.2.4	Análise térmica.....	49
3.1.2.5	Estudos de dissolução <i>in vitro</i>	51
3.1.2.6	Otimização e validação de metodologia de quantificação da EPI por cromatografia líquida de ultra eficiência.....	52
3.1.2.6.1	<i>Otimização do método analítico</i>	52
3.1.2.6.2	<i>Validação do método analítico</i>	53
3.2	ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI:βCD E EPI:HPβCD.....	55
3.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI:HPBCD POR DIFERENTES MÉTODOS: LIOFILIZAÇÃO, MALAXAGEM E NEBULIZAÇÃO.....	56
3.3.1	Material.....	56
3.3.2	Métodos.....	56
3.3.2.1	Estudo de solubilidade de fases.....	56
3.3.2.2	Obtenção da mistura física e dos complexos de inclusão.....	57
3.3.2.3	Caracterização físico química da MF, CI_{lio}, CI_{mal} e CI_{neb}.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA EPIISOPILOTURINA.....	59
4.1.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	59
4.1.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	60
4.1.3	Difração de raio-X.....	60
4.1.4	Análise térmica.....	61

4.1.5	Estudos de dissolução <i>in vitro</i>.....	65
4.1.6	Otimização e validação de metodologia de quantificação da EPI por cromatografia líquida de ultra eficiência.....	67
4.1.6.1	Otimização do método analítico.....	67
4.1.6.2	Validação do método analítico.....	70
4.2	ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI:BCD E EPI:HPBCD.....	75
4.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI:HPβCD POR DIFERENTES MÉTODOS: LIOFILIZAÇÃO, MALAXAGEM E NEBULIZAÇÃO.....	78
4.3.1	Estudo de solubilidade de fases.....	79
4.3.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	80
4.3.3	Microscopia eletrônica de varredura	82
4.3.4	Difração de raio-X.....	84
4.3.5	Análise térmica.....	85
4.3.6	Estudos de dissolução <i>in vitro</i>.....	89
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas (DN) são aquelas que acometem predominantemente a população de maior índice de pobreza do mundo e não representam um mercado lucrativo para as grandes indústrias farmacêuticas (SILVA et al., 2017). Também conhecidas como doenças tropicais (por afetarem principalmente populações pobres que vivem em climas tropicais e subtropicais), acometem mais de 1 bilhão de pessoas, de acordo com a organização mundial de saúde (WHO 2017).

Atualmente 17 são classificadas como negligenciadas, sendo elas: dengue, raiva, tracoma cegante, úlcera de Buruli, treponematose endêmica (bouba), hanseníase (doença de Hansen), doença de Chagas, tripanossomíase humana africana (doença do sono), leishmaniose, cisticercose, dracunculíase (doença do verme da Guiné), equinococose infecções por trematódeos, filariose linfática, oncocercose (cegueira dos rios), esquistossomose (bilharzíase), helmintíases transmitidas pelo solo (vermes intestinais) (WHO, 2017).

A escassez de recursos aplicados em pesquisa sobre o assunto retarda o desenvolvimento de tecnologias sociais e biomédicas que articulem promoção da saúde e prevenção dessas doenças (SILVA-PIRES et al., 2017). Assim, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos. (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Neste contexto, o jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus*) é umas das espécies mais exploradas comercialmente, devido à produção do alcaloide pilocarpina, o qual possui finalidades terapêuticas diversas, tais como: redução da pressão intraocular, combate a xerostomia e estímulo da musculatura lisa gastrointestinal (LAFFLEUR, F., RÖTTGES, 2019). Apesar do vasto conhecimento desta espécie, a extração de porte industrial da pilocarpina gera ao final do processo uma biomassa rica em diversos compostos não aproveitados para a saúde (MIURA, 2009). Dentre estes compostos, a epiisopiloturina (EPI) é o alcaloide de maior rendimento e apresentou promissoras atividades frente às doenças negligenciadas, tais como leishmaniose (MIURA, 2009) e esquistossomose (VERAS et al., 2012), além das suas atividades anti-inflamatória e antinoceptiva (SILVA et al., 2013).

Guimarães e colaboradores (2013) evidenciam em seus estudos a baixa solubilidade aquosa da EPI, e na tentativa de contornar este entrave, destaca-se a utilização de técnicas capazes de proporcionar o incremento da solubilidade e conseqüentemente o aumento da taxa de dissolução de compostos lipossolúveis (LYRA et al., 2010).

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

Entre os três tipos de CD's naturais, a de maior destaque é a beta-ciclodextrina (β CD), apresentando uma maior eficiência na complexação de fármacos (YANG, GAO & HUANG, 2017) e relativa facilidade de síntese e produção em larga escala, sendo este processo mais simples e financeiramente mais atrativo (KURKOV; LOFTSSON, 2013). Porém devido aos efeitos adversos relacionados ao seu uso (FERREIRA; ROCHA; SILVA 2009; XU et al., 2014), as CD's naturais vem sendo gradativamente substituídas pelas suas derivadas semi-sintéticas, levando também a busca de derivados mais solúveis e relativamente mais seguros, que ofereçam maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais, como por exemplo a Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) (SILVA-PIRES., 2017).

Existem diferentes métodos empregados para a preparação de CI, sendo objetivo geral deste trabalho a obtenção e caracterização de complexos de inclusão (CI) utilizando EPI e HP β CD por três técnicas diferentes: liofilização, malaxagem e nebulização, visando o melhor incremento de solubilidade da EPI.

Dentre as técnicas para caracterização de CI, destacam-se: Espectroscopia de absorção na região do infravermelho, Difração de Raio-X, Microscopia Eletrônica de Varredura, análise térmica (Termogravimetria, Calorimetria exploratória Diferencial) e o teste de dissolução *in vitro*. Os resultados obtidos serão um valioso instrumento para elucidação das características da EPI (quando na forma de CI), sendo possível traçar estratégias para o desenvolvimento racional de uma forma farmacêutica segura eficaz e inovadora para o tratamento da esquistossomose e leishmaniose.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Geral

Caracterizar a Epiisopiloturina e incrementar a sua solubilidade à partir da obtenção de complexos de inclusão por liofilização, nebulização e malaxagem.

1.1.2 Específicos

- ❖ Caracterizar a EPI empregando FTIR, DRX, MEV, análise térmica (TG/DTG, e DSC), cinética de degradação e avaliar o perfil de dissolução da EPI em meio básico;
- ❖ Otimizar e validar método analítico de quantificação da EPI por Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).
- ❖ Realizar estudos *in silico* de modelagem molecular de complexos de inclusão com a β CD e a HP β CD.
- ❖ Obter e caracterizar os CIs por liofilização, nebulização e malaxagem, pelas mesmas técnicas utilizadas para EPI.
- ❖ Comparar os perfis de dissolução da EPI frente aos CIs formados;

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EPIISOPILOTURINA (EPI)

A flora amazônica é rica em espécies medicinais de grande potencial econômico para a extração de PAs (SABÁ et al., 2002). Dentre as espécies de maior interesse mundial destaca-se o Jaborandi, pertencente ao gênero *Pilocarpus* e à família das Rutaceae. Há 16 espécies descritas para este gênero (SKORUPA, 1996), dentre estas 13 podem ser encontradas no Brasil e 11 são exclusivas do território brasileiro (SANTOS; MORENO, 2004). Dentre estas, destaca-se o *Pilocarpus microphyllus*, figura 1, considerado o “jaborandi legítimo” por apresentar o mais alto nível de alcaloides em suas folhas.

Figura 1- Imagens do *Pilocarpus microphyllus*, o “jaborandi legítimo” .



Fonte: Guimaraes et al 2018.

Todos estes tipos encontrados na natureza foram intensamente explorados a partir do isolamento e industrialização da PILO, cuja síntese é largamente dispendiosa e sua exploração feita inicialmente sem nenhum controle, através de coletores nativos da região amazônica

(SAWAYA *et al* 2010; SAWAYA, *et al* 2011). Este fitofármaco é utilizado na medicina humana e veterinária desde 1874 e apresenta finalidades terapêuticas diversas, com destaque a redução da pressão intraocular, combate a xerostomia e estímulo da musculatura lisa gastrointestinal (LARSSON *et al.*, 2008; MIURA, 2009 ;SAWAYA *et al.*, 2011; VERAS *et al.*, 2012).

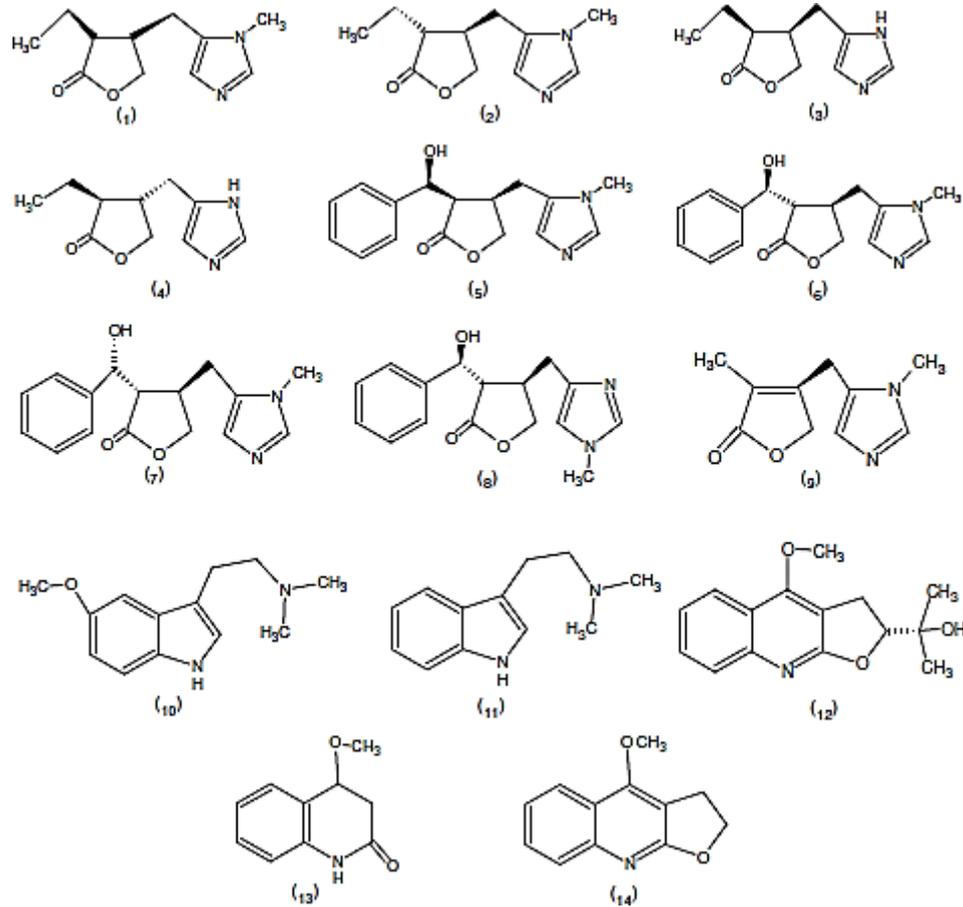
A exploração insustentável do gênero determinou a alta mortalidade das plantas, conseqüentemente a *P. microphyllus*, *P. alatus* e *P. trachylophus* foram incluídas em uma lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (PINHEIRO, 2002). Fato este que acelerou as ações para a domesticação do *P. microphyllus*, passando por etapas básicas de prospecção, coleta e avaliação do material selvagem para o cultivo e adaptação ao uso humano.

A extração e o isolamento da PILO ocorrem em parceria entre a empresa Anidro Extrações do Brasil S.A. (Parnaíba, PI, Brasil) sendo a companhia farmacêutica Merck (Darmstadt, Alemanha) encarregada da purificação e comercialização do alcaloide, encontrado na forma de colírio para tratamento de glaucoma (PINHEIRO, 2002; SAWAYA *et al* 2010; SAWAYA, *et al* 2011).

Estas e outras aplicações terapêuticas fazem com que a exploração do jaborandi seja responsável por uma grande demanda de recursos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, movimentando nestas cerca de 229 toneladas, que custam aproximadamente R\$ 920 mil reais de um total de R\$ 4,4 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no país, de acordo com pesquisa realizada em 2016 (IBGE, 2017).

Diante deste contexto, levando em consideração que tal atividade envolve a produção de 10.000 kg de folhas por ano e rendimento médio de 1% deste fitofármaco (PINHEIRO *et al* 2002; MIURA 2009), após sua extração é gerado um grande volume de resíduo (biomassa) composto por grande número de outras moléculas, a exemplo da isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina, figura 2 (SANTOS; MORENO, 2004).

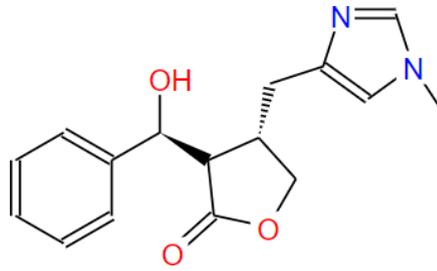
Figura 2- Estrutura dos alcalóides encontrados no gênero *Pilocarpus*



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

Dentre elas, a EPI (figura 3) é a molécula mais abundante desta biomassa, com rendimento calculado em cerca de 2 kg para 1500 Kg das folhas de jaborandi. Trata-se de um alcaloide imidazólico que foi identificado em 1978 por Voightlander e colaboradores e seu isolamento foi possível através da purificação da biomassa pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-Biotec da Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus Parnaíba*.

Figura 3- Estrutura da EPI, molécula mais abundante na biomassa gerada pela produção de Pilocarpina.



Fonte: Dados da pesquisa.

Sua extração acontece por meio de um processo químico de acidificação e filtração, seguido de alcalinização. O processo de extração, purificação e isolamento do alcalóide EPI originou numa patente que foi depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o número de registro (PI0904110-9 A2). Depois de pura, a EPI foi então cedida para realização de pesquisas científicas.

2.1.1 Epiisopiloturina versus doenças negligenciadas

O termo doenças negligenciadas (DN) é utilizado para um grupo de enfermidades que acometem predominantemente a população de maior índice de pobreza do mundo, nos quais as condições de infraestrutura e saneamento básico são precárias e altos são os níveis de exclusão social (FERES, CUCO, SILVA 2015). No âmbito industrial estas não representam um mercado lucrativo para as grandes indústrias farmacêuticas, em comparação à venda de medicamentos voltados para: doenças cardíacas, obesidade e doenças psiquiátricas, como a depressão, por exemplo.

O quadro das DNs também está relacionado a insuficiência de métodos de diagnósticos, ausência de vacinas e atenção básica da população, além do pequeno arsenal terapêutico, propiciando a permanência destas na lista de doenças mais endêmicas no país e na América Latina (SILVA-PIRES et al 2017).

O Brasil tem o maior número de casos e maior carga de doença relacionadas às DN da região latino-americana e caribenha, destacando-se como principal responsável no período 2008-2014 pelos casos de dengue (40%), doença de Chagas (25%), esquistossomose (96%), hanseníase (86%), helmintoses intestinais (24%), leishmaniose cutânea (39%), leishmaniose visceral (93%), leptospirose (92%), malária (36%) (HOTEZ; FUJIWARA, 2014).

As opções terapêuticas disponíveis atualmente são muito limitadas, insuficientes e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes (DIAS, DESSOY 2013). Por este motivo diversos estudos vêm sendo realizados para incentivar os investimentos na Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novas terapias. Recentemente foi revelado que menos de 5% dos investimentos globais em P&D de medicamentos foram destinados a este grupo de enfermidades (HOTEZ et al 2009; JAKOBSEN et al 2011; CHAPMAN et al, 2016).

A exploração ética da biodiversidade brasileira se faz de grande relevância dado o conhecimento popular abundante do país, principalmente quando destinadas ao tratamento de DN. A opção de conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades encurta o percurso do desenvolvimento de uma nova droga, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, de uma indicação de qual atividade biológica esta droga poderia apresentar (FUNARI; FERRO 2005).

Neste contexto, a partir do reaproveitamento de moléculas presentes no montante de material vegetal descartado anualmente e sabendo do seu alto rendimento, dentre as demais moléculas, seguiu-se os testes com a EPI afim de identificar atividades biológicas mais significativas do que as terapias disponíveis atualmente no mercado, frente ao *S. Mansoni* e *Leishmania amazonenses*.

Através de ensaios *in vitro* realizados por Miura (2009), foi evidenciada a significativa atividade Leshimanicida da EPI contra a forma amastigota, fase parasitária real que causa a infecção em seres humanos e cães, do *Leishmania amazonenses*, na concentração de 128 µg/mL. Tal resultado merece destaque, uma vez que os medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento desta doença atuam apenas na sua fase promastigota (BANETH; SHAW, 2002).

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

Tabela 1 - Atividade esquistossomicida da EPI

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

Legenda: PZQ: Praziquantel. DMSO= Dimetilsulfóxido. Fonte: adaptado de Veras et al., 2012.

2.1.2 Outras atividades biológicas da EPI

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

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

Estudos também foram realizados para investigar a ação anti-inflamatória da EPI na mucosa do cólon de ratos tratados com trinitrobenzenosulfônico (TNBS) como modelo da doença de Crohn (DC) experimental (CARVALHO et al 2018). A inflamação faz parte da etiopatogenia da DC que afeta todo o trato digestivo, desde a boca até o ânus, e tem significância clínica substancial. Como resultado, foi Evidenciando o seu efeito protetor na regulação negativa de processos inflamatórios através da inibição da síntese e liberação de produtos de inflamação, peroxidação lipídica e a expressão de enzimas inflamatórias.

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

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

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

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

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

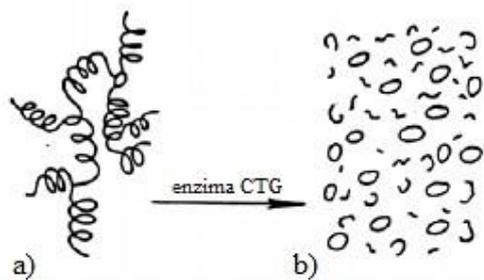
As CDs têm sido particularmente exploradas por desempenhar um papel crucial no que diz respeito à liberação controlada de fármacos. Os sistemas de entrega de fármacos (*Drug Delivery System*), oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (FERREIRA; ROCHA; SILVA 2009). Na indústria farmacêutica, CDs são

utilizadas principalmente para melhorar a estabilidade e solubilidade de PA e suas propriedades organolépticas, como o sabor e odor em formulações farmacêuticas. Podendo também ser utilizadas para mascarar o cheiro e sabor desagradáveis de alguns fármacos, líquidos de processo em compostos sólidos bem como reduzir a sua volatilidade (GUEDES et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2011; RUZ et al., 2012; XU et al., 2014).

2.2.1 Histórico e conceito das ciclodextrinas

A descoberta das primeiras CD's data de aproximadamente 117 anos atrás, quando o cientista A. Villiers, em 1891, relatou em seus estudos ter isolado e identificado uma substância cristalina chamada "cellulosine", a partir da degradação bacteriana de amido, sendo este o primeiro caso descrito na literatura, Figura 4 (VILLIERS, 1891; GUEDES et al., 2008).

Figura 4- Formação de dextrinas cíclicas e acíclicas a partir do amido. a) amido b) dextrinas cíclicas e acíclicas.



Fonte: Saenger, 1980.

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

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

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

2.2.2 Características das ciclodextrinas

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

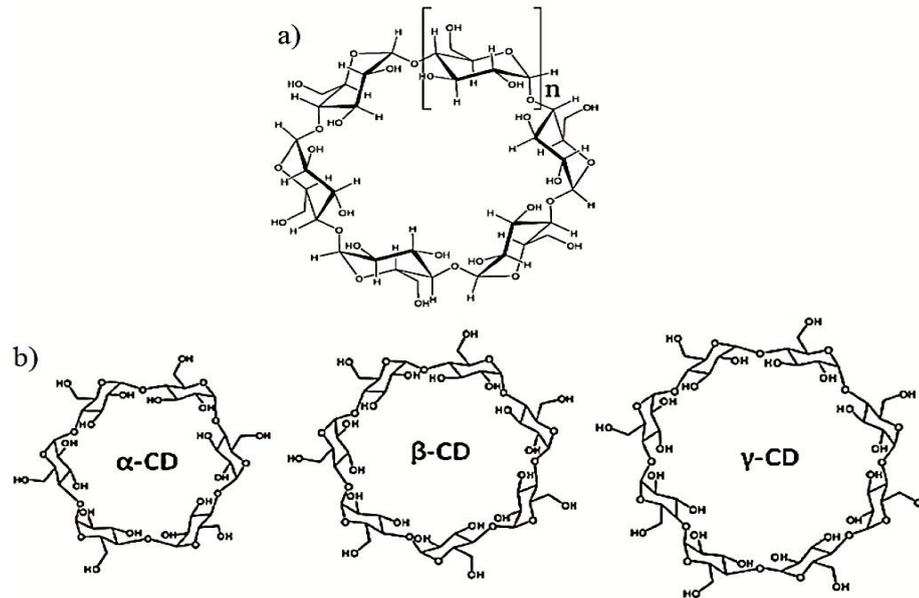
Esta informação corrobora com os dados presentes na literatura, que relatam que as CDs mais comuns e com maior rendimento são as do tipo α - ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) e γ -ciclodextrina (γ CD), também chamadas de ciclodextrinas naturais, sendo estas formadas por 6, 7 e 8 UG, respectivamente (figura 5) e (tabela 2) (GUEDES et al., 2008; RASHEED et al., 2008; LAZAROWSKA; JÓZEFOWICZ; HELDT, 2012; LIU et al., 2014; LOUIZ et al., 2015).

Tabela 2- Características físico-químicas das ciclodextrinas naturais.

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

Fonte: Adaptado de Singh et al (2010).

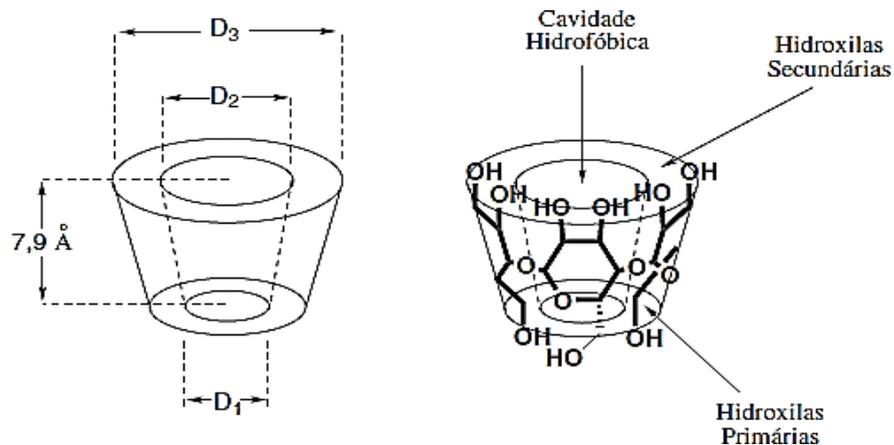
Figura 5- a) Estrutura molecular geral das CDs b) estrutura das ciclodextrinas naturais.



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

No estado natural as CDs são moléculas rígidas, cristalinas e homogêneas, que oferecem inúmeras utilidades em função do seu tamanho, forma e grupos funcionais livres (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). A partir da elucidação de sua estrutura tridimensional foi possível comprovar que as CDs se apresentam na forma espacial cônica, cuja superfície externa apresenta características hidrofílicas, devido à posição ocupada pelas hidroxilas primárias unidas ao átomo de carbono C6 e as hidroxilas secundárias ligadas aos átomos de carbonos C2 e C3 (figura 6). No entanto, o posicionamento do oxigênio das ligações glicosídicas e dos hidrogênios das unidades de glicosídicas, estando estes, voltados para a parte interna da estrutura, faz com que as CDs tenham uma cavidade interna de caráter hidrofóbico (Del VALLE, 2004; PIRES, 2011). Propriedades esta que torna estes açúcares capazes então de encapsular em seu interior moléculas lipofílicas, aumentando assim a solubilidade em água, a estabilidade e biodisponibilidade de fármacos (ALEEM et al., 2008; ZHANG et al 2013a).

Figura 6- Representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas



Fonte: Ferreira; Rocha e Silva (2009).

2.2.3 Ciclodextrinas naturais X ciclodextrinas modificadas

Entre os três tipos de CDs naturais, a de maior destaque é a β CD, pois esta apresenta uma maior eficiência na complexação de fármacos (ZHANG et al., 2011) e relativa facilidade de síntese e produção em larga escala, sendo este processo mais simples e financeiramente mais atrativo (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

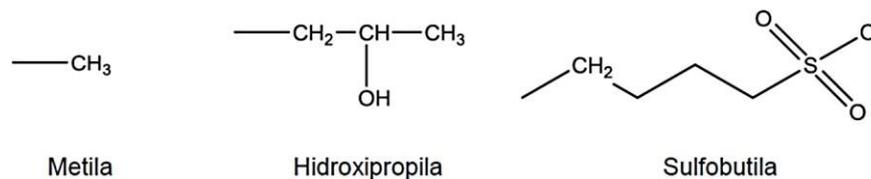
Utilizada para fins farmacêuticos, estendendo a sua aplicação em diferentes campos de atuação, como por exemplo: nas eletroanálises (CHEN et al., 2011), na biotecnologia (YANG et al., 2009), na proteção de ambientes (ZHANG et al., 2012), bem como em produtos alimentares (HU et al., 2012a ; HU et al.,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

Apesar da sua vasta aplicação, a β CD apresenta uma baixa solubilidade em água (aproximadamente 2%) (DAVIS; BREWSTER, 2004; QIU et al., 2014). Adicionalmente, em determinadas concentrações, esta apresenta uma grande afinidade com colesterol podendo carregá-lo da membrana lipídica de células e, em concentrações suficientemente altas, pode causar hemólise dos eritrócitos (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999). Sua administração parenteral não é possível devido a sua baixa lipofilicidade, que a faz precipitar como microcristais nos rins, além do fato de formar complexos com o colesterol que se acumulam e danificam os néfrons (FERREIRA; ROCHA; SILVA 2009; LUKE et al., 2010; XU et al., 2014).

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

Estes derivados, mais conhecidos como ciclodextrinas modificadas, podem ser sintetizadas a partir da α , β e γ CD através da substituição dos hidrogênios das hidroxilas ligadas ao carbono 6 por grupos hidroxipropila, metila e sulfobutila principalmente (figura 7) (PIRES, 2011). Loftsson e Duchene (2007) citaram que substituições de qualquer grupamento OH por moléculas hidrofóbicas tais como grupos metoxi resultam em drástico aumento de sua solubilidade aquosa.

Figura 7- Radicais mais utilizados nas substituições dos hidrogênios presentes nas hidroxilas das CDs.



Fonte: Pires, 2011.

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

A HP β CD é largamente utilizada como agente complexante (RUAN et al., 2008), devido a sua expressiva solubilidade aquosa (ZHANG et al., 2013b), em torno de 60% superior a do tipo beta (QIU et al., 2014). Sendo esta a primeira CD a ser aprovada pela Food and drug administration (FDA) (FRANZINI, 2011). É bem tolerada em seres humanos, mostrando uma baixa toxicidade por via oral, não sendo visualizada assim a toxicidade renal e atividade hemolítica vista com a β CD (LIU et al., 2006; MA et al., 2012; ZOELLER et al., 2012). Além disso, tem sido utilizada para sistemas de liberação de fármacos oftálmicos. Estudos *in vitro* e em *in vivo* mostram que CIs de droga com baixa solubilidade aquosa, utilizando esta CD, aumentam a solubilidade, estabilidade, permeabilidade da córnea refletindo na sua maior

biodisponibilidade oftálmica (BOZKIR; DENLI; BASARAN, 2012; ZHANG et al 2013a).

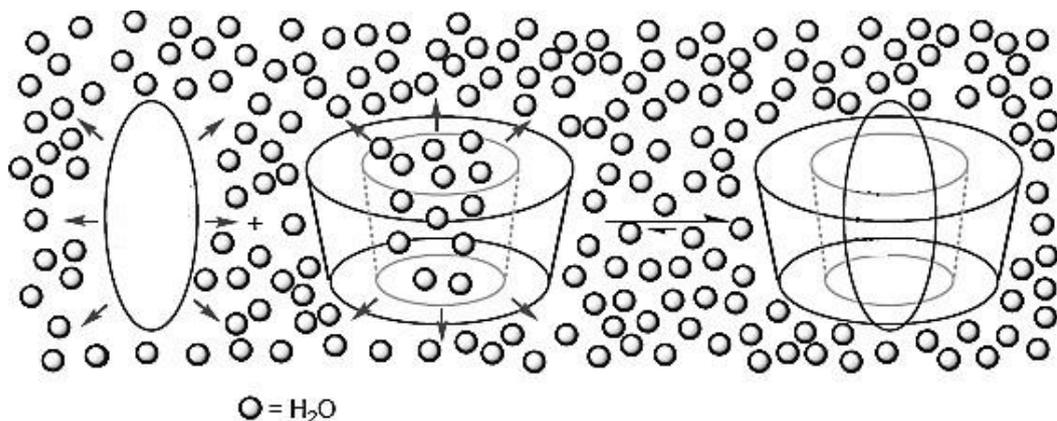
2.2.4 Formação de complexos de inclusão

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

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

Quando em solução aquosa de CD, as moléculas de água preenchem a cavidade da CD, estando em um estado energeticamente menos favorável são substituídas por moléculas do fármaco (figura 8). Desta forma a cavidade central da CD atua como uma molécula “hospedeira”, podendo alojar em seu interior uma molécula “hóspede” total ou parcialmente (BUDAL 2003; ASTRAY et al., 2009)

Figura 8- Métodos de obtenção dos complexos de inclusão.



Fonte: Adaptado de Astray et al, 2009.

Quando o CI é administrado, independente da via escolhida, ocorre dissociação deste complexo com conseqüente liberação da molécula hóspede. Se estabelece assim um equilíbrio dinâmico entre as formas livres da CD, do fármaco e do CI. A liberação depende da quantidade de líquido que circunda o complexo, e se dá pelo processo de diluição deste ou pelo deslocamento competitivo com substâncias lipofílicas, endógenas no organismo, e que possuam

maior afinidade com a cavidade (LOFTSSON; DUCHENE, 2007). Ocorrendo a dissociação, o fármaco encontra-se na forma livre e apto para que seja absorvido e distribuído pelo organismo, uma vez que complexado ele não conseguiria atravessar as membranas devido à característica hidrofílica da CD, o que justifica a sua baixa toxicidade.

2.3 MODELAGEM MOLECULAR PARA ELUCIDAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE FÁRMACO: CICLODEXTRINA.

O estudo de modelagem molecular (MM) tem sido cada vez mais utilizado nas etapas de obtenção e desenvolvimento de novas drogas. Trata-se de um conjunto de ferramentas computacionais voltadas para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos (BARREIRO, 1996). Podendo ser atribuído também o termo *in silico*, por fazer uso de computadores na aplicação de modelos teóricos que descrevem as possíveis interações intermoleculares.

A indústria farmacêutica vem passando por grandes transformações guiadas pelas inovações científicas e tecnológicas em seus programas de P&D de fármacos. Os modelos tradicionais de pesquisa básica estão progressivamente dando lugar a estratégias modernas baseadas em uma combinação de especialidades atuando em caráter multi e interdisciplinar (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008).

Nesse contexto a utilização da MM é fundamental na otimização e rápida identificação de moléculas promissoras, capaz de reduzir em até 50% os custos e tempo gastos para desenvolvimento de um novo medicamento, devido à sua alta preditividade e confiabilidade, diminuindo significativamente o número de moléculas que precisam ser sintetizadas e/ou testadas experimentalmente (GELDENHUYS *et al.*, 2006; RABELO, 2016).

Existem diferentes estratégias para P&D de fármacos que utilizam a MM, como por exemplo o planejamento baseado na estrutura do receptor (*structure- based drug design – SBDD*). A docagem molecular (do inglês, *molecular docking - MD*), é um dos principais métodos de SBDD e consiste na predição da conformação bioativa de micromoléculas (ligantes) no sítio de ligação de uma macromolécula (Receptor, ex: enzimas, proteínas) (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008).

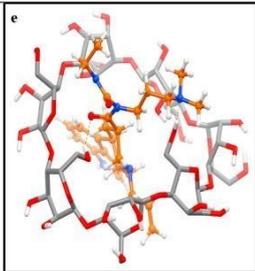
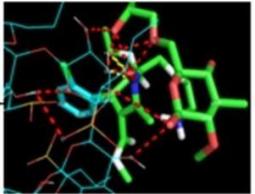
Através da MD é possível determinar a existência de interações favoráveis entre ligantes e receptores, explorando o encaixe destas duas moléculas buscando sempre a configuração mais estável energeticamente (DAS *et al* 2018). Atualmente, a indústria farmacêutica tem utilizado

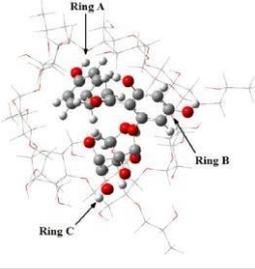
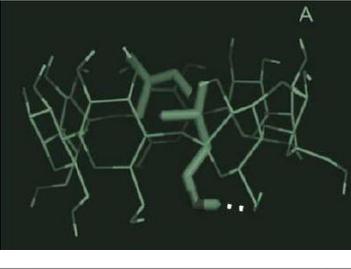
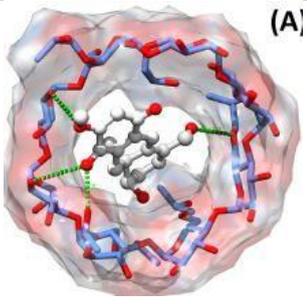
bastante a MD como estratégias de planejamento de novos sistemas entre insumo farmacêutico ativo (IFA) e grandes moléculas voltadas para incremento de solubilidade, como o caso das CDs. Tendo como vantagem do seu uso a confirmação (teórica) da formação do complexo IFA:CD,

A área da tecnologia farmacêutica está sempre em busca da inovação, seja para a descoberta de novos medicamentos ou otimização dos já existentes. Para tal a complexação de um IFA pouco solúveis no interior da cavidade hidrofóbica de uma CD depende de interações favoráveis para que ocorra a formação do CI de forma segura e estável. O *docking* acaba sendo a ferramenta que auxilia todo esse processo, tornando possível a visualização *in silico* de tais pontos de interação entre IFA:CD e servindo como direcionamento na escolha do tipo de CD, pontos de interação, tipos de ligações, o que direciona os estudos para as melhores opções de CI.

Como terminologia, trata-se o fármaco em questão como molécula *guest* (hóspede) e a macromolécula como *host* (hospedeira), com uma relação *host:guest*. Existem vários trabalhos na literatura que reportam o uso de diversas abordagens *in silico* com o objetivo de elucidar o mecanismo de interação entre *host* e *guest* principalmente entre IFAs e CD. A tabela 3 mostra alguns exemplos do uso de MM em trabalhos recentemente publicados em revistas científicas.

Tabela 3- Exemplos atuais do uso da modelagem molecular na obtenção de complexos de inclusão com diferentes ciclodextrinas.

<i>Host:guest</i>	<i>Imagem</i>	<i>Fonte</i>
β CD: cabergolina		PRIYA et al 2018.
SB β CD: anlodipina		NANDA et al 2018.

HP β CD:Floridizin		ZHANG et al 2017
βCD:Citronela		SANCHES et al 2019.
HP γ CD: oncocalixona A		XAVIER- JÚNIOR et al 2019

Fontes: descritas na própria tabela.

Um possível entrave na MM voltada para CI pode ser a falta de um banco de dados com as estruturas tridimensionais das CDs (naturais e modificadas). Para tal, já é possível verificar na literatura a existência de um software para construção de modelos teóricos de derivados de CD e avaliação de suas interações *host:guest*, o Cyclomolder (RABELLO et al 2019).

2.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

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

A caracterização é o foco principal dos estudos de pré- formulação (LAU, 2011), realizado nas etapas de pesquisa pré-clínica e clínica, visando acumular o máximo de informações sobre o comportamento do fármaco (RODRIGUES et al 2005), e a partir de então, serem desenvolvidas formulações mais eficazes, seguras e conseqüentemente com maiores

possibilidades de êxito (COSTA, 2010; MAXIMIANO; COSTA; SOUZA, 2010). Neste processo, os protótipos a fármacos merecem destaque (SOVIZI, 2010), pois representam candidatura a novas alternativas terapêuticas para a sociedade, mas não possuem parâmetros de qualidade estabelecidos.

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

Para tanto, são empregadas diversas técnicas analíticas na caracterização de fármacos no estado sólido, sendo a Espectroscopia de absorção na região do infravermelho, difração de raio-X, Microscopia eletrônica de varredura, análise térmica e ensaios de dissolução *in vitro* algumas das mais utilizadas.

2.4.1 Espectrometria de absorção na região do infravermelho

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

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

2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. O MEV parte da otimização dos simples microscópios ópticos (MO), capazes de produzir aumentos máximos de imagens em até 2000 vezes, acima disso é preciso

utilizar feixes de elétrons (no lugar de fótons, utilizados no MO) para melhor resolução, permitindo aos aparelhos modernos aumentos de até 300.000 vezes ou mais, para a maior parte dos materiais sólidos (DEDAVID; GOMES ; MACHADO 2007).

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de compostos sólidos. Bastante empregada em várias áreas do conhecimento, sendo amplamente utilizada para estudar os aspectos de superfície dos materiais. O uso desta técnica vem se tornando mais frequente por fornecer informações detalhadas do estado de cristalização de IFAs, capaz obter imagens da topografia da superfície de identificar a morfologia do cristal que compõem a amostra analisada (LYRA et al 2010) ou a falta de uma formação rígida, característica de sólidos amorfos, estando arrançados de forma aleatória.

2.4.3 Difração de raios-x

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

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

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

2.4.4 Análise térmica

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

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

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

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

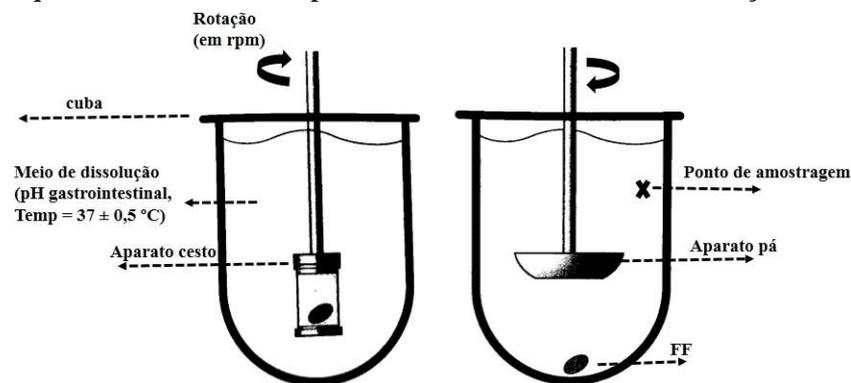
2.4.5 Ensaio de dissolução *in vitro*

Os eventos biológicos que ocorrem no organismo após a administração de um fármaco são variados e complexos. Antes do IFA ser absorvido na corrente sanguínea, um medicamento administrado por via oral é exposto às condições dinâmicas do lúmen gastrointestinal que podem influenciar na sua atividade terapêutica.

Somente fármacos dissolvidos podem atravessar a mucosa intestinal. Se a sua solubilidade no fluido aquoso for restrita, a dissolução será a etapa limitante da velocidade de absorção e vai determinar a rapidez e extensão de sua disponibilidade na corrente sanguínea. (AULTON & TAYLOR 2016). À velocidade pela qual o processo de dissolução ocorre é um conceito dinâmico, representando a quantidade ou concentração de fármaco que se dissolve por unidade de tempo (BANAKAR, 1992; MANADAS et al., 2002; NERY et al., 2007).

O objetivo de avaliar esta situação *in vitro* é medir a taxa pela qual o IFA é liberado a partir da forma farmacêutica (FF) e dissolve-se em um meio de dissolução particular. A Farmacopéia brasileira 5ª Edição (2010) descreve as condições e equipamentos que devem ser utilizados para realização deste tipo de ensaio, sendo as condições empregadas bem definidas para permitir a comparação dos dados observados, como ilustrado na figura 9.

Figura 9- Esquema ilustrativo dos parâmetros de um teste de dissolução *in vitro*.



Legenda: FF= Forma Farmacêutica; RPM = Rotação por minuto. Fonte: Adaptado de Aulton & Taylor 2016.

Parando para analisar os requisitos importantes pode-se correlacioná-los com o que é observado *in vivo*. É necessária a utilização de uma rotação (movimentos peristálticos), meio de dissolução (referentes aos valores de pH observados entre estômago e intestino) e a temperatura utilizada é correspondente à corporal. Os aparatos são escolhidos de acordo com as características da FF analisada e tipo de ensaio.

Visando a obtenção de uma forma farmacêutica de liberação imediata, os estudos de dissolução podem ser classificados em três categorias, que permitem avaliar e comparar a

eficiência de dissolução de um determinado produto, sendo elas: 1) ensaio de um único ponto; 2) ensaio de dois pontos; 3) perfis de dissolução. Neste último se avalia a porcentagem dissolvida da molécula em diferentes tempos de amostragem, o que permite uma análise mais detalhada e conclusiva (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

No caso de novas moléculas, torna-se importante avaliar o impacto de fatores que interferem em sua dissolução, como por exemplo, as propriedades sólidas dos insumos farmacêuticos (polimorfismo e tamanho de partícula). Realizar estes testes *in vitro* permite a visualização do seu comportamento em função do tempo a fim de diminuir os possíveis problemas que esta possa apresentar em relação à biodisponibilidade (ARANCIBIA et al., 1992).

2.4.6 Método analítico de quantificação – importância da validação.

Existem diferentes metodologias capazes de quantificar uma amostra de forma segura e confiável. Na caracterização de IFA destacam-se o uso de técnicas como a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta visível (UV/Vis) e a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As técnicas espectrofotométricas estão fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas que depende tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas. De acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho, podendo ser utilizada como técnica de identificação e quantificação de substâncias (BRASIL 2010).

Os espectros podem ser obtidos utilizando-se diferentes modos de aquisição. No caso da espectrofotometria UV/Vis o principal modo é a transmissão. Espectrofotômetros podem dispor de registradores gráficos que permitem a obtenção de espectros de absorção. Tal recurso é importante para fins de caracterização da substância a partir da obtenção dos comprimentos de onda onde se obtém as maiores absorvâncias (máximo). Atualmente, a maior parte dos espectrofotômetros apresenta conexão a um microcomputador e programa apropriado, que permitem a obtenção dos espectros de absorção das substâncias em meio digital. A análise espectrofotométrica quantitativa por absorção tem como princípio a relação direta existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a

fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada (CASSIANO et al 2009).

Os resultados cromatográficos são obtidos pelos detectores presentes no equipamento. Um dos mais utilizados contém detectores de comprimento de onda múltiplo e medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado na forma de cromatograma (SABIR et al 2013).

Os sistemas de CLAE são calibrados comparando-se as respostas dos picos obtidos com as respectivas concentrações de substâncias químicas de referência (SQR). Resultados quantitativos confiáveis são obtidos por meio de calibração com padrão externo, quando injetores ou amostradores automáticos são preferencialmente utilizados. Esse método envolve a comparação direta das respostas obtidas com os picos, separadamente analisados, das soluções padrão e amostra.

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. Definida como 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).

Existem alguns órgãos que disponibilizam guias para realização do processo de validação, à nível nacional e internacional. No Brasil pode-se contar com a resolução mais atual, disponibilizada pela ANVISA, a Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 166, publicada em 24 de julho de 2017. Nesta, constam os parâmetros que devem ser avaliados e as devidas especificações necessária para realizar a validação de um método analítico, sendo estes detalhados à seguir.

2.4.6.1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (RABINI et al 2004; CASSIANO et al 2009). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva analítica*. 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 (BRASIL, 2017).

Os resultados devem ser apresentados através da representação gráfica em função da concentração do analito, equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados. Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5% cujo coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990, de acordo com a resolução vigente.

2.4.6.2. Robustez

De acordo com o INMETRO (através do seu guia atualizado em 2018), a robustez de um método (“robustness”) mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Em outras palavras, pode-se dizer que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros.

No caso do uso da CLAE pode-se avaliar por exemplo, variações na concentração dos solventes orgânicos, composição da FM, pH, programação da temperatura do forno do equipamento, modo de preparo das amostras, fabricante de solventes e materiais utilizados, entre outros. Tudo isso para garantir que mesmo com tais modificações as respostas cromatográficas se mantenham quando se mude o analista, os equipamentos ou até mesmo o laboratório de análise (SABIR et al 2013).

2.4.6.3. Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas e diluentes (BRASIL, 2017).

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades e estruturas similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse e cabe ressaltar que, caso a seletividade de um determinado método não seja assegurada, a linearidade, exatidão e precisão estarão seriamente comprometidas.

2.4.6.4. Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão determinam os erros de uma medida analítica e são os principais critérios usados para julgar a qualidade de um método bioanalítico.

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Podendo ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Sendo a resposta avaliada pelo cálculo do desvio Padrão Relativo, respeitando o percentual máximo de 5% de acordo com o estabelecido pela Resolução de 2017. Por sua vez a exatidão está diretamente relacionada, sendo este o parâmetro que de fato evidencia a confiabilidade dos resultados obtidos. Se diz exato, quando a resposta analítica observada está em concordância com a resposta ideal (concentração ou resposta de referência aceita como verdadeira).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA EPIISOPILOTURINA

3.1.1 Material

A EPI foi extraída e isolada pela indústria Anidro do Brasil Extrações S.A., situada na Parnaíba (PI), conforme metodologia descrita por Verás e colaboradores (2013). Sendo sua purificação realizada pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-Biotec da Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Parnaíba, que cedeu a matéria prima necessária para conclusão deste projeto.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A análise espectroscópica das amostras foi realizada em espectrômetro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de seloneto de zinco. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR em triplicata. Foram obtidas com varreduras de 4000 a 650 cm^{-1} de resolução espectral de 4 cm^{-1} e média de 16 varreduras (*scans*) por espectro.

3.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

As imagens foram obtidas através de um Microscópio eletrônico de varredura (modelo Zeiss EVO LS-15). Usando a geometria coplanar do feixe de elétrons, o detector EDS, câmara EBSD e a direção de inclinação de amostra. Tensão de aceleração 0,2 a 30 kV. Corrente de sonda 0,5 pA a 5 μA . Análise de raios-x 8,5 mm e ângulo de inicialização de 35°.

As micrografias foram obtidas com ampliações variando entre 500 e 2000 vezes e as análises foram realizadas no Laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LIKA), localizado na Universidade Federal de Pernambuco.

3.1.2.3. Difração de raio-X

As análises por DRX foram realizadas em um equipamento da Shimadzu®, modelo XRD-600, usando radiação $\text{Cu}_{K\alpha}$ de $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$. A contagem do tempo foi de 0,6 segundos para cada passo de 0,02°, com intervalo de varredura de 5 a 50° (2 θ). Os difratogramas obtidos foram

comparados com as cartas padrões JCPD cadastradas no ICDD (*International Centre of Diffraction Data*). Estas análises foram realizadas na Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégias do Nordeste (CETENE) em Recife-PE.

3.1.2.4. Análise térmica

- Calorimetria exploratória diferencial

As curvas DSC para caracterização térmica das amostras foram obtidas por meio de um calorímetro da marca Shimadzu[®], modelo DSC-60, na faixa de temperatura de 30 a 300°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. Foi utilizada massa de 2 mg ($\pm 0,2$), acondicionadas em porta-amostras de alumínio hermeticamente fechados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A calibração do DSC foi realizada via ponto de fusão do Índio ($156,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$) e Zinco ($419,6^\circ\text{C} \pm 0,3$). O fluxo de calor e entalpia foram calibrados via ponto de fusão do Índio ($18,59 \text{ J.g}^{-1} \pm 0,3$), sob as mesmas condições das amostras. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS[®] (Therma Analysis) versão 2.20 da Shimadzu[®].

- Termogravimetria

As curvas TG/DTG foram obtidas a partir de uma termobalança Shimadzu[®], modelo DTG-60H, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 100 mL.min⁻¹, na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e faixa de aquecimento de 30 a 600°C. Para este método foram utilizadas amostras de 5 mg ($\pm 0,2$), acondicionadas em porta-amostra de platina. Antes dos ensaios verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado com perdas de massa definidas. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS[®] (Thermal Analysis) versão 2.20 da Shimadzu[®].

- Cinética de degradação térmica

O estudo da cinética de degradação foi realizado conforme modelo proposto por Flynn-Wall-Ozawa- (FWO) em 1966, utilizando curvas TG não-isotérmica nas razões de aquecimento de 5; 10; 20 e 40°C.min⁻¹. O cálculo da Energia de ativação foi realizado através do gráfico que correlaciona $\log \beta$ vs $1/T$ (K⁻¹).

Na TG não-isotérmica/dinâmica, tem-se a curva gerada pela perda de massa em função da temperatura e gradiente utilizado na análise. Em uma reação no estado sólido, o grau de conversão (α) em um experimento não-isotérmico pode ser dado pela Equação 1:

$$\alpha = \frac{m_0 - m}{m_0 - m_\infty} \quad \text{Equação 1}$$

Onde m é a massa em cada instante a uma temperatura T , m_0 é a massa inicial e m_∞ a massa final do experimento. A equação geral que descreve a taxa de conversão $\left(\frac{d\alpha}{dt}\right)$ em uma reação cinética de estado sólido é representada pela Equação 2:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad \text{Equação 2}$$

No qual $k(T)$ é uma constante de velocidade de reação e $f(\alpha)$ representa uma função que descreve a conversão da reação. Substituindo a equação de Arrhenius na Equação 2, conforme procedimento adotado na literatura obtém-se a Equação 3:

$$\frac{d\alpha}{dt} = Af(\alpha)e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Equação 3}$$

Como a temperatura da amostra pode ser controlada mediante determinada razão de aquecimento constante $\left(\Phi = \frac{dT}{dt}\right)$, o grau de conversão da reação pode ser analisado como uma função da temperatura. Nesse caso, existe uma dependência da temperatura e do tempo de aquecimento em relação à razão de aquecimento (Φ) utilizada no experimento. Portanto, a equação geral que descreve a taxa da reação em um experimento não-isotérmico é expressa pela Equação 4:

$$\frac{d\alpha}{dt} = \frac{A}{\Phi} e^{\frac{-E_a}{RT}} f(\alpha) \quad \text{Equação 4}$$

No método FWO, o modelo que descreve a reação é independente das razões de aquecimento utilizadas nos experimentos, podendo ser representado através de uma função integral de conversão ($g(\alpha)$) (Equação 5):

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = \frac{A}{\Phi} \int_{T_i}^T e^{\frac{-E_a}{RT}} dT = \frac{AE_a}{\Phi R} p(x) \quad \text{Equação 5}$$

Onde, logaritmando a Equação 5, tem-se a Equação 6:

$$\log g(\alpha) - \log p(x) = \log \frac{Ae^a}{\Phi R} \quad \text{Equação 6}$$

No qual $\log \frac{Ae^a}{\Phi R}$ é um termo independente da temperatura. Devido ao fato de que a integral de Arrhenius não possui solução analítica, muitas vezes é necessária a utilização de aproximações numéricas para estimativa de parâmetros cinéticos não isotérmicos. Nesse trabalho, a aproximação numérica utilizada para a integral de Arrhenius (Equação 7).

$$\log p(x) = -2,315 - 0,4567x \quad \text{Equação 7}$$

No qual, $x = \frac{E_a}{RT}$, considerando um intervalo de $\log p(x)$ entre $20 < x < 60$.

Combinando as Equações 6 e 7 e rearranjando, chega-se a Equação de FWO (Equação 8) amplamente utilizada em estudos cinéticos de degradação térmica.

$$\log \Phi = \log \left(\frac{Ae^a}{R} \right) - \log g(\alpha) - 2,315 - 0,4567 \left(\frac{E_a}{RT} \right) \quad \text{Equação 8}$$

A utilização do método FWO requer a realização de experimentos em diferentes razões de aquecimentos, onde através desses experimentos, o grau de conversão α é representado por uma relação linear de $\log \Phi$ vs. $\frac{1}{T}$. Através da aplicação do princípio isoconversional, não é necessário o conhecimento da função matemática que descreve o mecanismo de reação ($g(\alpha)$) para o cálculo da energia de ativação. O termo $\log \left(\frac{Ae^a}{R} \right) - \log g(\alpha) - 2,31$ na Equação 8, é tratado como uma constante, a qual está contida informações sobre a $g(\alpha)$. Esta constante pode ser determinada através do coeficiente linear da relação $\log \Phi$ vs. $\frac{1}{T}$.

3.1.2.5. Estudos de dissolução *in vitro*

Foi utilizado o dissolutor Varian® VK7010, com o aparato II da USP (aparato pá), com rotação de 50 rpm. Em cada cuba, adicionaram-se 250 mL do meio de dissolução (pH 6,8 USP), mantendo a temperatura em $37 \pm 0,3$ °C. Os pontos de coleta foram: 10, 15, 20, 30, 60, 90 e 120 min. Em cada ponto, foram retiradas alíquotas de 3 mL do meio de dissolução, com o auxílio de uma seringa e posterior reposição do volume retirado. A altura da coleta das amostras foi fixada conforme especificado no método geral de dissolução da Farmacopéia Brasileira 5ª

edição (BRASIL, 2010). Foi utilizada, para cada amostra, o valor referente a 10% da concentração de saturação da EPI, a fim de se obedecer a relação *sink*.

Ao final, as amostras obtidas foram filtradas em filtro de membrana 0,45 μm e devidamente diluídas para posterior quantificação da EPI por espectroscopia no UV-vis a 200 nm (Modelo B582, Micronal[®]), utilizando o meio de dissolução como o branco do equipamento, para eliminação de possíveis interferentes. De acordo com os resultados e auxílio da curva de calibração, foram determinadas as concentrações de EPI em cada tempo de coleta e encontrado o valor de área sobre a curva (*AUC*), pelo software OriginPro[®].

3.1.2.6. Otimização e validação de metodologia de quantificação da EPI por cromatografia líquida de ultra eficiência.

3.1.2.6.1 Otimização do método analítico.

- *Material*

Para otimização do método foram utilizados os solventes: ácido Fosfórico (Dinâmica[®] Lote: 62816), trietilamina (Dinâmica[®] Lote: 79126), Metanol (Honeywell[®] Lote: DT335-BR) grau HPLC, hidróxido de sódio (Vetec[®] 1203202), água ultra purificada MiliQ[®], Filtro de membrana de 0,45 μm . Sendo as vidrarias utilizadas devidamente limpas e calibradas.

- *Métodos*

Foi utilizado como método de quantificação inicial o descrito por Avancini e colaboradores (2003) e a partir deste foram feitas algumas modificações.

- *Fase móvel*

A fase móvel é constituída por uma mistura (fase aquosa + fase orgânica) composta por 13,5 mL de ácido Fosfórico, 3mL de trietilamina, 850 ml de água MiliQ[®] e 112 ml de Metanol grau HPLC, sendo necessário a correção do pH com a adição de hidróxido de sódio para obtenção de uma solução final com pH igual a 2,5.

- *Parâmetros*

Foi utilizada uma coluna C18, marca supelco[®] com tamanho de 25cm x 4,6mm. O fluxo da fase móvel de 1ml/min. Forno em temperatura ambiente e volume de injeção da amostra de 20 μL .

- *Equipamento*

Utilizou-se cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu[®] equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20AC-A_{HT}, forno para coluna CTO-20A, detector no UV/Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com software LC Solution[®].

- *Preparo das amostras*

Para a obtenção da solução-estoque (1 mg/mL) pesou-se 25 mg de EPI, vertido para um balão volumétrico de 25 mL. Neste foi adicionado metanol[®] grau HPLC, próximo ao menisco do balão e colocado em sonicador por 10 minutos, garantindo a solubilização total da EPI. Em seguida foi completado o volume e desta solução-estoque retiradas as alíquotas para a obtenção das soluções de trabalho, que para melhores resultados analíticos foram diluídas com a porção aquosa da fase móvel utilizada no equipamento.

3.1.2.6.2 *Validação do método analítico.*

O método de quantificação, já com as devidas modificações realizadas no item anterior, foi então validado de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017 da Agência nacional de vigilância sanitária – ANVISA, de acordo com os parâmetros: Linearidade, Robustez, Seletividade, Precisão e Exatidão.

- *Linearidade*

Foram obtidas três curvas de calibração independentes, com cinco pontos cada uma (50, 100, 200, 300 e 350 µg/mL). As amostras foram obtidas a partir de diluições da solução-estoque, permitindo a obtenção da média dos valores encontrados em cada concentração testada, bem como o cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva e do coeficiente de correlação linear (r^2).

- *Robustez*

As pequenas modificações realizadas no método proposto, escolhidas para compor tal parâmetro foram: 1. Diferença de fabricante do hidróxido de sódio utilizado na obtenção da parte aquosa da fase móvel; 2. Uso do sonicador na obtenção da solução-estoque e 3. Obtenção da solução-estoque com a parte aquosa da FM. O ponto médio obtido pela curva de calibração

referente ao parâmetro linearidade (200 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliado em relação às estas pequenas alterações e os resultados obtidos foram avaliados frente aos resultados do método original.

- Seletividade

Foi então escolhido para a avaliação da seletividade utilizar a PILO (alcaloide estruturalmente semelhante à EPI). Dessa forma, foi obtida uma solução-estoque da PILO (nas mesmas condições descritas para a EPI). Estando as soluções-estoques prontas, foram retiradas alíquotas destas e transferidas para um balão volumétrico de 10 mL, a fim de se obter uma solução de trabalho contendo os dois IFA's na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida a solução foi filtrada com auxílio de filtro de seringa de 0,45 μm , para preparação das amostras (triplicata) e leitura em equipamento. Como resultado analítico foi levado em consideração a pureza dos picos da EPI e PILO observados.

- Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária (BRASIL, 2017). Para repetibilidade, foram testadas 6 soluções (200 $\mu\text{g/mL}$) de EPI preparadas individualmente pelo mesmo analista. A precisão intermediária foi realizada também em sextuplicata, com a mesma concentração (200 $\mu\text{g/mL}$) em 2 dias diferentes por 2 analistas diferentes, nas mesmas condições e equipamento, sendo as amostras obtidas de soluções independentes. Finalizada as análises foram obtidos os valores médios das determinações e estimado o desvio padrão relativo (DPR) e exatidão dos resultados.

- Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados em um determinado ensaio com o valor de referência aceito como verdadeiro. Foram realizados ensaios em triplicata, nos três níveis de concentração, totalizando nove eluições. As amostras analisadas foram obtidas de acordo com diluições a partir da solução estoque (concentrações: 50, 200 e 350 $\mu\text{g/mL}$). Após o término dos ensaios foram calculados os valores percentuais correspondentes aos níveis de concentração das amostras avaliadas (BRASIL, 2017).

3.2 ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI: β CD E EPI:HP β CD.

A MM foi aplicada com o objetivo de elucidar as razões intermoleculares e calcular a energia de interação dos complexos de inclusão formados entre o *guest* (EPI) e os *hosts* (β CD e HP β CD). Existem vários relatos na literatura sobre CI entre fármacos e CDs utilizando modelagem molecular (CAVALCANTI et al., 2011; SILVA et al 2016; XAVIER-JUNIOR et al 2017). Para levar em conta aspectos relevantes da síntese de derivados de CD, os seguintes pontos foram considerados: (i) A regioseletividade da reação ocorre preferencialmente com as hidroxilas primárias OH (6), uma vez que são mais acessíveis, seguido das hidroxilas secundárias OH (2) com a maior acidez ($pKa = 12,2$) (Wenz, 1994). (ii) a formação de derivados homólogos com os índices de substituição molar (MS) (Treib, Baron, Grauer, & Strauss, 1999) mais baixo e mais alto também são obtidos, além do produto (Wenz, 1994).

Nossa abordagem foi construir um modelo com 1000 estruturas (40 configurações com 25 conformações diferentes, cada) para o derivado HP β CD, a partir da estrutura tridimensional da β CD (SAENGER et al., 198). As 40 configurações foram construídas considerando os dois aspectos da síntese mencionados acima. Quanto à razão de MS de 0,7 parece razoável assumir que a estrutura da HP β CD (7 unidades de glicose) possui, em média, 5 unidades HP. Portanto, foram construídas 20 configurações com 5 unidades de HP, 10 com 4 unidades de HP e outras 10 com 6 unidades de HP.

Para seleção da posição de substituição de cada unidade de HP adicionada, durante a construção das estruturas, foi considerada a probabilidade de 70% para OH (6), 20% para OH (2) e 10% para OH (3). Os valores de energia de interação intermolecular para os complexos de inclusão *host:guest* foram calculados utilizando o programa de Autodock VINA (TROTT & OLSON, 2010), considerando toda a estrutura do *host* como sitio ativo e com o parâmetro *exhaustiveness* ajustado em 8. Toda a metodologia de modelagem molecular foi realizada de forma automatizada, utilizando a plataforma CycloMolder (RABELLO et al 2019).

3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI:HPBCD POR DIFERENTES MÉTODOLOGIAS: LIOFILIZAÇÃO, MALAXAGEM E NEBULIZAÇÃO.

3.3.1 Material

Além da EPI, já descrita anteriormente, foi utilizada a HP β CD, obtida através de doação pela empresa Ashland Specialty Ingredients[®] e como solventes para esta etapa do projeto foram utilizados álcool metílico absoluto (VETEC, lote: 04382) e água destilada como veículo.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Estudo de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade foi obtido de acordo com Higuchi e Connors (1965). Para tal, foi obtida uma solução estoque de HP β CD na concentração de 200 mM e a partir desta foram feitas soluções filhas de 10 mL de HP β CD nas concentrações: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 40 e 50mM. Amostras de EPI em excesso foram colocadas em erlenmeyers contendo tais soluções, em triplicata. A EPI também foi avaliada apenas em 10mL de água destilada, para determinação de sua concentração de saturação, servindo de parâmetro para as demais amostras. Todos os erlenmeyers, devidamente identificados, foram colocados na incubadora (Marca Solab[®], modelo Shaker SL 222) a 150 rpm, temperatura de 25 °C \pm 0,5°C, por 7 dias.

Ao final, o conteúdo de cada um foi vertido para tubos falcon e centrifugados por 10 minutos em centrífuga (marca Edutec[®], modelo 90-2B) e as soluções sobrenadantes diluídas e quantificadas em espectrofotômetro (marca Varian[®], modelo Vankel 50 UV/Vis) no comprimento de onda de 200 nm.

A constante de estabilidade aparente (K_C , L/mol) do complexo foi calculada a partir do estudo de solubilidade de fases, de acordo com Higuchi e Connors (1965). Para análise dos dados foi obtida a concentração de saturação da EPI em meio aquoso bem como nas diferentes concentrações de HP β CD com auxílio do Excel[®].

3.3.2.2 Obtenção da mistura física e dos complexos de inclusão.

- Obtenção da mistura física (MF)

A MF foi obtida respeitando a proporção equimolar (EPI:CD), na proporção de 1:1. Pesou-se o equivalente em grama de cada um dos constituintes, em seguida, com o auxílio do grau e pistilo foram triturados por um minuto e armazenados em frasco âmbar em dessecador.

- Obtenção do complexo de inclusão por liofilização (CI_{LIO})

Inicialmente se repete o procedimento de obtenção da MF. Em seguida a mesma foi vertida para um becker de dois litros de capacidade para adição de água destilada sob agitação, à temperatura constante de 50°C até total solubilização. A solução resultante foi mantida em ultrafreezer à baixa temperatura por 48 horas para total congelamento do material e assim ser submetida ao processo de liofilização. Utilizando como parâmetros: A pressão de 30µHg, temperatura de aproximadamente -55°C por 75 horas. O pó resultante foi retirado do liofilizador (marca Liotop[®], modelo L101) e armazenado em frasco âmbar hermeticamente fechado no dessecador.

- Obtenção do Complexo de inclusão por malaxagem (CI_{MAL})

Foi obtida a MF (referente ao item 4.3.2.1.) e em seguida, no próprio grau utilizado foi adicionado lentamente uma mistura de MeOH-água (50:50, v/v) até a formação de uma pasta homogênea. Posteriormente colocada em estufa a 60°C por 8 horas. Após a secagem total do material este foi macerado e o pó resultante foi tamizado (250 mm) para acondicionamento em frasco âmbar hermeticamente fechado.

- Obtenção do Complexo de inclusão por nebulização (CI_{NEB})

Igual à obtenção por liofilização, foi obtida uma solução nas mesmas condições, sendo realizada a sua secagem por nebulização (mini spray dryer, modelo B-290, BÜCHI) sob as seguintes condições: com temperatura de entrada do ar 180 °C e saída 122 °C, pressão de ar de pulverização de 15 mmHg e aspirador 100%.

3.3.2.3 Caracterização físico química da MF, CI_{LIO}, CI_{MAL} e CI_{NEB}

Os produtos obtidos foram caracterizados através de técnicas físico-químicas, visto a sua importância na avaliação da eficiência da complexação (LYRA et al 2010; FREITAS et al., 2012). As técnicas escolhidas foram as mesmas utilizadas para a caracterização da EPI, sendo

elas: FTIR, MEV, DRX, Análise térmica (TG e DSC), e a determinação do perfil de dissolução (para os três CIs formados).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA EPIISOPILOTURINA

4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier .

Afim de se confirmar a identidade da EPI, foi obtido o seu espectro de IV, evidenciando todos os deslocamentos, dobramentos e estiramentos presentes na molécula do IFA. Suas bandas mais expressivas (figura 10 e tabela 4), características dos grupos funcionais presentes na sua estrutura foram expostas, estando em concordância com os trabalhos já obtidos pelo grupo (VERAS et al 2003, MELO et al 2014).

Figura 10- Espectro de absorção na região do infravermelho do protótipo EPI.

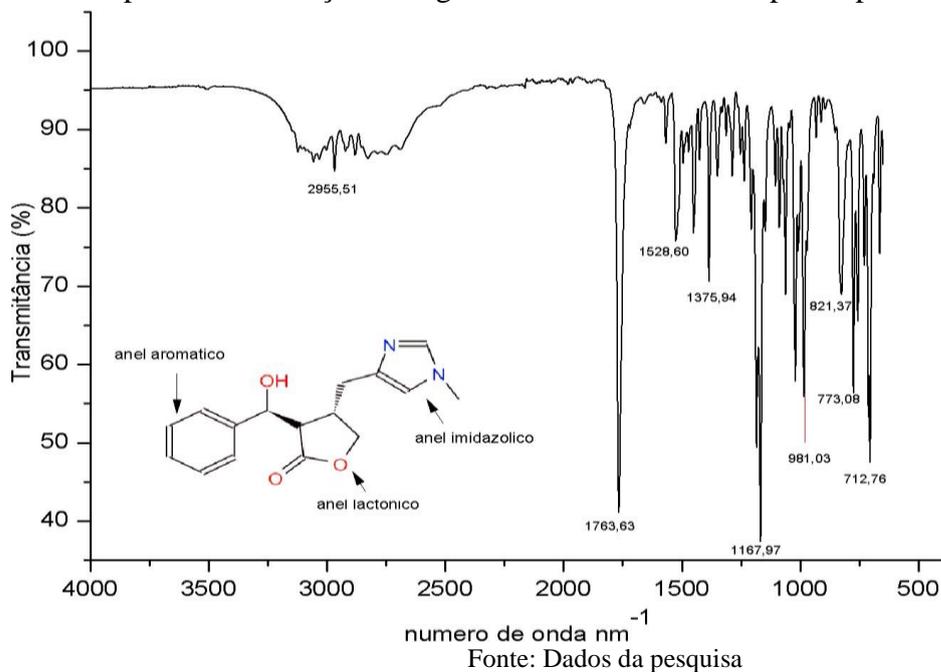


Tabela 14- Valores atribuídos as bandas mais expressivas do espectro da EPI e respectivos grupos funcionais.

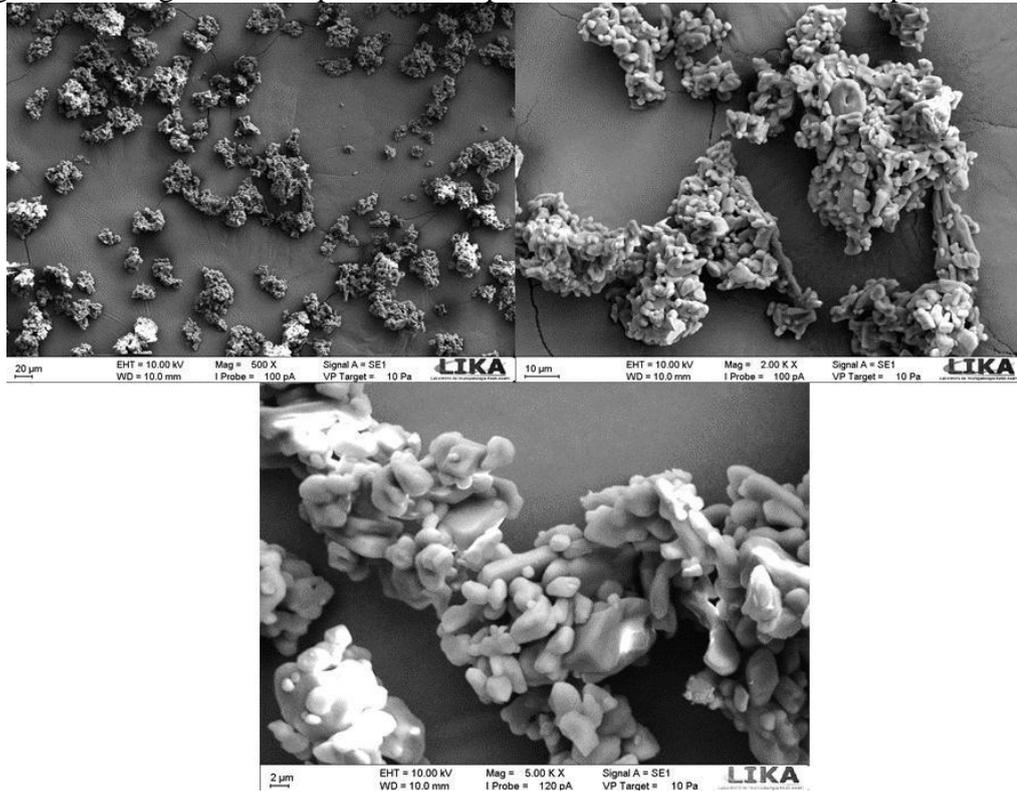
Frequência do grupo nm^{-1}	Grupos funcionais relacionados
712,76	C-C-C- Em fase (Anel aromático)
773,06	C-H Em fase (Anel aromático)
821	C-H fora do plano (imidazol)
981	Alongamento (lactona)
1167	CH ₂ (C4), c (lactona)
1528	N-C-N (imidazol)
1763	Alongamento (C=O lactona)

Fonte: Dados da pesquisa

4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

Através das Fotomicrografias obtidas (figura 11), visualiza-se os cristais de EPI distribuídos na forma de aglomerados, com padrões irregulares de tamanho e formatos variados, porém observa-se um possível comportamento cristalino.

Figura 11- Imagem da EPI por microscopia Eletrônica de varredura, ampliada 5000x.

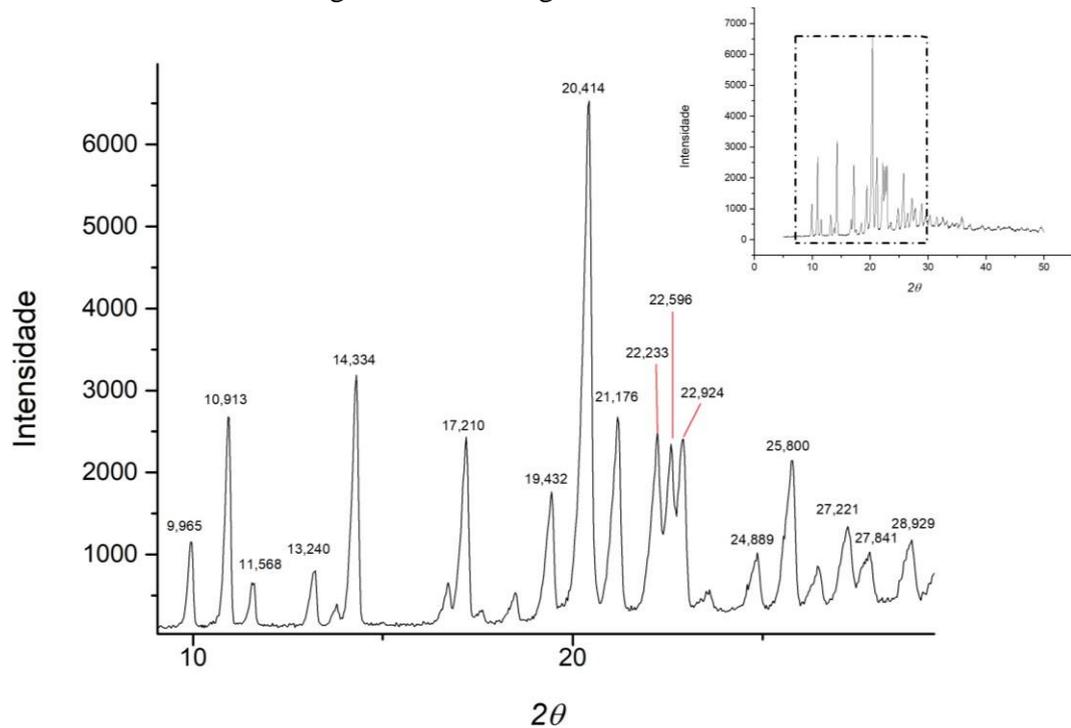


Fonte: Dados da pesquisa

4.1.3 Difração de raio X

O perfil difratométrico da EPI confirmou a natureza cristalina da amostra, observada no MEV. Na figura 12 foi obtida uma ampliação da região mais intensa, que apresenta os picos mais expressivos da EPI. Foi possível evidenciar numerosos picos de difração de alta intensidade, sendo o maior deles visualizado em $20,414^\circ$, além da presença dos secundários em: $10,913^\circ$ - $14,334^\circ$ - $17,21^\circ$ - $19,432^\circ$ - $21,176^\circ$ - $22,596^\circ$ e $22,924^\circ$. Estes dados estão expostos na figura 12, que apresenta uma imagem mais ampliada referente a região mais significativa do difratograma, estando estes em conformidade com estudo já realizado por Melo e colaboradores (2014).

Figura 12- Difratoograma da EPI.



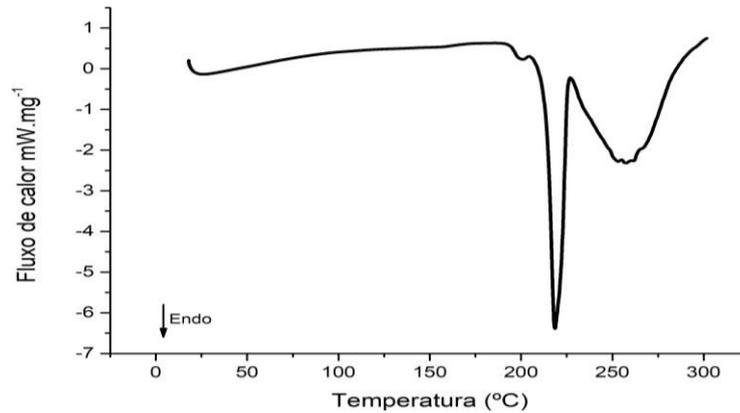
Fonte: Dados da pesquisa

4.1.4 Análise térmica.

- Calorimetria exploratória diferencial

Com a obtenção da curva DSC tem-se a confirmação do perfil térmico da EPI, quando somados aos resultados obtidos pela TG/DTG. A curva DSC apresenta um pico endotérmico, bem intenso e definido (figura 13), característico do processo de fusão da sua estrutura cristalina iniciando em aproximadamente 205°C ($T_{\text{pico}} = 219,23^\circ\text{C}$) ($\Delta E = 152,05 \text{ J.g}^{-1}$). Logo em seguida, visualiza-se outro evento endotérmico referente a degradação térmica da amostra.

Figura 13- Curva DSC da EPI, razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

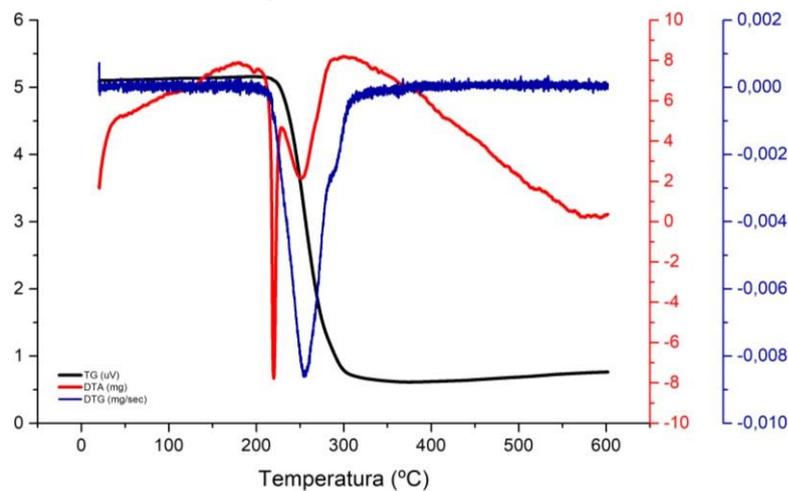


Fonte: Dados da pesquisa

- Termogravimetria

A partir da TG (figura 14) é possível visualizar que a degradação térmica da EPI acontece em dois eventos, sendo o primeiro mais significativo com temperatura inicial de aproximadamente 211°C e perda de massa de 74,07%, estando de acordo com os resultados obtidos por Melo e colaboradores (2014). Apenas com a curva TG não é capaz de identificar com clareza o início do segundo evento, sendo este então confirmado através da derivada da TG (DTG). Nesta, os eventos são evidenciados na forma de picos onde fica visível um pico endotérmico maior seguido de outro que aparece sobreposto, porém nota-se sua presença na curva, identificando assim a existência de outro evento térmico.

Figura 14- Curva TG, DTG e DTA da EPI, sob razão de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio de $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$



Fonte: Dados da pesquisa

Em relação a perda de massa, as curvas TG/DTG indicam que a decomposição térmica do protótipo é praticamente completa até aproximadamente 344°C, restando um resíduo de cerca de 14% em relação à massa inicial.

- Cinética de degradação térmica não isotérmica

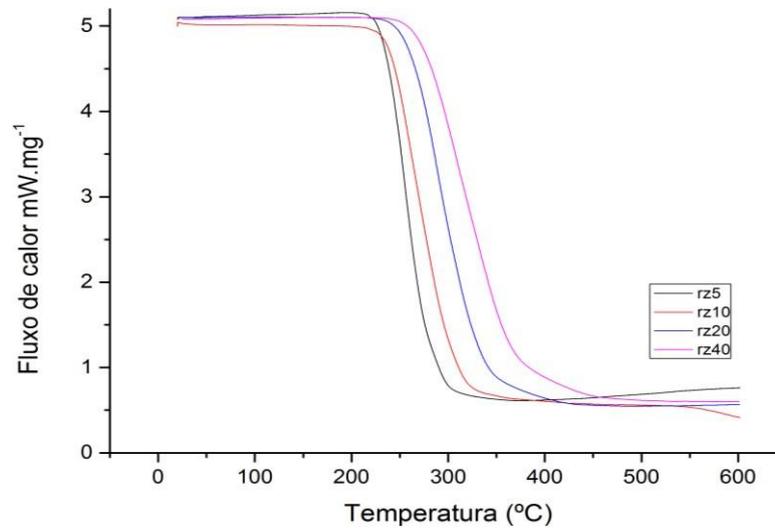
A avaliação da cinética de degradação vem sendo bastante aplicada para caracterização da estabilidade de novos compostos (CLEMENTE et al 2014). Para tal, se faz necessário a escolha do modelo cinético mais adequado.

Dentre os mais utilizados pode-se destacar o método isoconvencional proposto por FWO. Neste afirma-se que a decomposição térmica de um material obedece a uma reação de primeira ordem. Além disso, o método permite determinar a energia de ativação (E_a) em diferentes estágios sem a necessidade do emprego da função matemática que descreve o mecanismo de reação (ANDRADE et al., 2007).

É possível encontrar trabalhos que relatem a aplicação desta metodologia a partir das curvas DSC, utilizada para diferentes tipos de materiais (ANDRADE et al 2008; GHADERI et al 2015) porém escolheu-se a TG para determinação da cinética, pois tal técnica tem demonstrado ser o método mais empregado para o estudo e a compreensão da cinética de decomposição térmica de um composto (ANDRADE et al 2017; AZIMI H.R., REZAEI. M., MAJIDI, F, 2014; SANTOS e MORAES 2015).

Foram então obtidas as curvas TG da EPI em diferentes razões de aquecimento (RZ), figura 15. Devido a sua maior significância, a cinética foi obtida a partir do primeiro evento térmico, escolha baseada nas informações presentes na tabela 5 que evidencia a temperatura inicial (T_{onset}) e final (T_{endset}) de degradação além do percentual de massa da amostra envolvido em cada razão testada.

Figura 15- Curvas TG da EPI em diferentes razões de aquecimento fluxo de nitrogênio de 100 mL.min⁻¹.



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 5- Valores obtidos a partir dos cálculos da cinética de degradação térmica, para os dois eventos térmicos da EPI.

	Evento 1			Evento 2		
	T _{onset} (°C)	T _{endset} (°C)	Massa (%)	T _{onset} (°C)	T _{endset} (°C)	Massa (%)
RZ5	211,78	282,41	75,92	282,41	313,16	10,48
RZ10	211,57	302,04	74,7	302,04	344,38	11,46
RZ20	209,96	310,92	59,8	310,92	366,7	24,1
RZ40	224,24	323,26	45,49	323,26	415,63	38,82

Fonte: Dados da pesquisa

Vale salientar que a escolha da RZ é uma etapa importante para o planejamento e execução destas análises, visto que esta apresenta influência qualitativa na curva TG. A medida que se aumenta a razão perde-se a definição de alguns eventos, podendo induzir a sobreposições e até mesmo gerar dificuldades na identificação do início e término do mesmo (BIANCHI et al 2010). Em contrapartida, quanto menor ela for, mais demoradas e dispendiosas se tornam as análises.

Para determinação da cinética de degradação não isotérmica a obtenção destas curvas proporcionou a correlação de $\log\beta \times 1.K^{-1}$. Assim, foi possível a obtenção dos valores da E_a envolvida (Figura 16a, tabela 6). FWO definem que a fração de conversão que melhor descreve o processo é aquela que apresenta o coeficiente de relação linear (R^2) mais próximo da unidade.

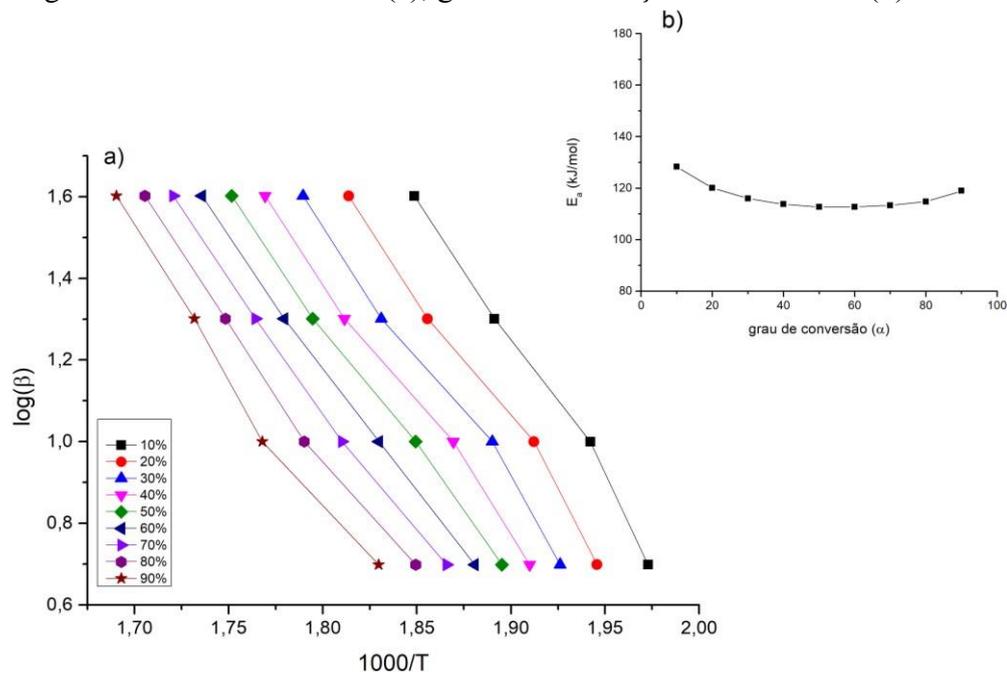
Sabendo disso, o gráfico obtido (figura 16b) mostra que tal método foi aplicável para a determinação da E_a da EPI para as frações de conversão (α) de 40, 50, 60 e 70%, cujos R^2 obtidos foram iguais a 0,99. As frações de 10, 20, 30 e 80% apresentaram coeficientes em torno de 0,98, para 90% se obteve o valor mais baixo, aproximadamente 0,97.

Tabela 6- Relação entre os valores obtidos de Coeficiente de correlação linear e os valores de Energia de ativação para cada fração de conversão.

Fração (%)	Coeficiente de correlação linear	E_a (KJ/Mol)
10	0,987	128,25
20	0,987	120,09
30	0,988	115,95
40	0,992	113,73
50	0,997	112,68
60	0,998	112,69
70	0,995	113,33
80	0,988	114,77
90	0,978	118,92

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 16- Gráfico de FWO (a); gráfico E_a x fração de conversão (α) da EPI.



Fonte: Dados da pesquisa

Dentre os parâmetros obtidos através desta abordagem, a E_a é o de maior interesse para avaliar a estabilidade de compostos farmacêuticos (VECCHIO et al., 2001; NETO, 2013),

podendo ser utilizada para o estabelecimento de um perfil comparativo de estabilidade entre vários fármacos e suas associações, onde quanto maior a E_a , maior a estabilidade térmica do composto (SOVISI et al., 2010). A figura 16b mostra a relação entre a E_a e a fração de conversão (α) para a amostra de EPI, atingindo o maior valor, aproximadamente 128 kJ/Mol em 10%.

4.1.5 Estudos de dissolução in vitro

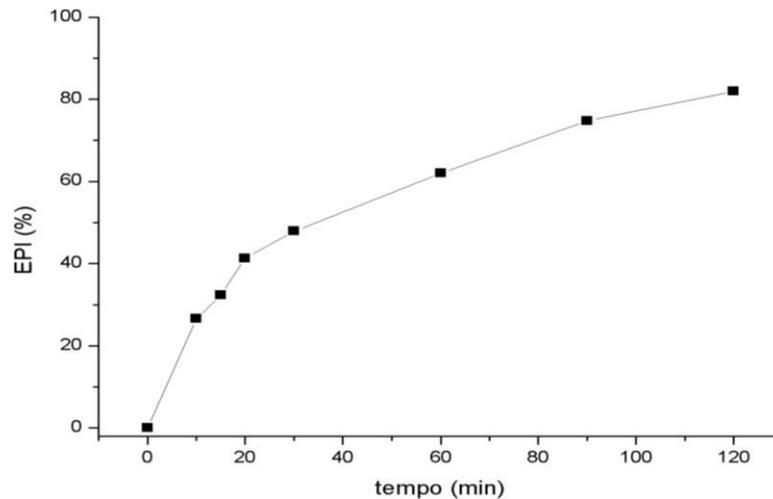
O ensaio foi realizado utilizando o meio básico (pH 6,8) a fim de se obter o máximo de informação a respeito do comportamento da EPI neste valor de pH fisiológico. Tal meio foi escolhido levando em consideração uma característica intrínseca da molécula muito importante, o pKa.

A EPI já teve seu valor de pKa determinado em trabalhos anteriores (VIEIRA 2016; MELO 2015), desenvolvidos por este grupo de pesquisa (igual a $7,46 \pm 0,29$). Pode-se então deduzir a partir deste que, quanto menor o valor de pH (quanto mais ácido) maior a concentração de sua forma ionizada (caráter hidrofílico), desfavorecendo o processo de permeabilidade da EPI através das membranas plasmáticas devido ao comportamento lipofílico destas. Conseqüentemente uma grande parte dela estaria susceptível ao processo de metabolização e eliminação do organismo, por não ser absorvida.

Desta forma, justifica-se a utilização do meio escolhido (pH 6,8) pois fazendo uma correlação com o já exposto, quanto mais básico for o pH, aproximando-se este do valor determinado de pKa, maior a concentração do protótipo na sua forma molecular sendo esta permeável. Chegando então a problemática deste projeto, pois além da baixa permeabilidade ela também apresenta uma baixa solubilidade nesta faixa de pH.

A figura 17 evidencia o percentual de EPI dissolvido para cada tempo de coleta estabelecido. É possível visualizar uma reta ainda crescente, apresentando um ponto máximo apenas no último tempo de coleta (120 minutos) no qual foi observado um percentual de 81,94 %. Desta forma o seu perfil de dissolução em pH básico é lento, sendo dissolvido apenas 47,89 % aproximadamente, nos primeiros 30 minutos. Tais resultados Reforçam a necessidade do incremento de solubilidade da EPI, já que para a determinação de um perfil de dissolução rápida é preciso, no mínimo, de 85% do IFA dissolvido em até 30 minutos (BRASIL, 2010)

Figura 17- Perfil de dissolução da EPI em meio de pH 6,8.



Fonte: Dados da pesquisa

4.1.6 Otimização e validação de método de quantificação da EPI por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

4.1.6.1 Otimização do método analítico

Para a quantificação da EPI, os trabalhos publicados até o ano de 2018 utilizam como base o método analítico proposto por Avancini e colaboradores (2003), que se propõe a quantificar alcaloides presentes no jaborandi, estando a Pilocarpina (PILO) em evidência. Neste caso, o autor utiliza o doseamento por CLAE para verificar a quantidade de pilocarpina presente nas diferentes partes do jaborandi (folhas, caule, por exemplo) e quais os parâmetros que influenciam positivamente para um maior teor deste alcaloide.

Como já foi citado anteriormente neste trabalho, a EPI é oriunda do montante residual gerado pela extração, isolamento e purificação da PILO, podendo ser detectada nos métodos analíticos e descrita como uma impureza do produto final (bem como os demais alcaloides). O que facilita a obtenção de uma metodologia específica e eficaz na quantificação da EPI, através da otimização e adaptação dos parâmetros analíticos.

É possível encontrar na literatura várias modificações já descritas, à depender dos objetivos de cada trabalho. Barnabé em 2009, realizou uma análise comparativa entre a quantificação de PILO e EPI extraídas por uma nova metodologia utilizando fluidos supercríticos. A partir destes resultados, o método se mostrou eficaz nas condições usadas para identificação dos dois componentes.

Miura em 2009, desenvolve uma dissertação de mestrado voltada para a identificação das atividades farmacológicas da EPI, sendo esta quantificada por CLAE. Veras e colaboradores (2013) aplicaram outro método de quantificação, onde a EPI apresentou um tempo de retenção em 50 min, tornando-o pouco prático e econômico (método oriundo de modificações, à partir de Avancini 2003).

Em 2015 Guimarães e colaboradores realizaram testes para avaliação da atividade contra helmintos e células (jovens e adultas) de *Schistosoma mansoni* e no ano de 2016, Lima e colaboradores abordam em seu trabalho a determinação do teor de EPI presente em diferentes cultivos da planta *Pilocarpus microphyllus*. A reprodução do método, para os dois trabalhos foi realizada tal qual a publicação de 2013, fazendo uso de uma FM com valor de pH (2,5) e temperatura do forno em 50 °C.

Diante de todas as modificações já observadas, tornou-se difícil a reprodução de tais condições, o que refletiu diretamente na continuidade das atividades práticas do grupo de pesquisa. Desta forma, foram realizados pequenos ajustes, visando a adaptação de alguns parâmetros para utilização da CLUE e consecutiva validação do método obtido, partindo do proposto por Avancini e colaboradores (2003).

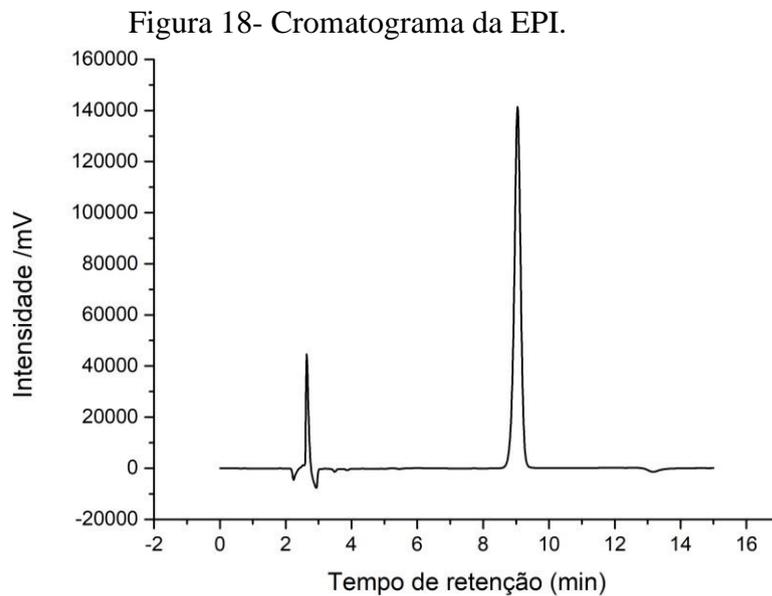
Inicialmente foi observado que a temperatura do forno varia entre à ambiente (AVANCINI et al 2003, VERAS et al 2013), 30 °C (LIMA et al 2016) e 50 °C (BARNABÉ 2009). Tal parâmetro foi ajustado, sendo preferível trabalhar com um valor de temperatura padronizado, evitando interferência nos resultados pela dificuldade de manter uma temperatura do ambiente “constante” devido oscilações de condições climáticas, para todos os dias de análise. Em contrapartida, para maior sobrevida dos constituintes do equipamento, optou-se por utilizar 30 °C.

Outro parâmetro relevante é o valor de pH da FM. O equipamento utilizado na execução destes experimentos apresenta como limite mínimo um pH de FM igual a 3,0, (estabelecido para prolongar a vida útil de seus componentes), tornando inviável a utilização de valores abaixo disso. Este valor foi então padronizado para o método definitivo.

Por último, foi corrigida a forma de obtenção da FM que é composta por uma porção aquosa e orgânica, foi alterada para que a junção destas fosse feita diretamente no equipamento, pela injeção dos componentes em bombas diferentes, sendo possível assim padronizar e excluir possíveis erros na obtenção da FM. De acordo com os resultados cromatográficos observados, mostrou-se mais adequado a proporção (porção aquosa: porção orgânica) de 85:15.

Tal modificação tornou necessária a diminuição do fluxo da FM de 1 mL/min para 0,8 mL/min, sendo justificada pela modificação no percentual de MeOH. A EPI por apresentar uma alta solubilidade e interação com este solvente, apresentou uma diminuição significativa no tempo de retenção, ficando este muito próximo ao volume morto da coluna. Com a diminuição do fluxo, foi possível realizar este ajuste.

Com base nas pequenas alterações, o método de escolha para a quantificação da EPI nas etapas seguintes deste trabalho terá os seguintes parâmetros: temperatura do forno em 30°C, porção aquosa da FM acidificada de pH 3 e preparada separadamente do MeOH, na proporção de 85:15 (porção aquosa:MeOH). Tais modificações foram consideradas satisfatórias, pelos parâmetros cromatográficos obtidos (Figura 18, tabela 7).



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 7- Dados cromatográficos para a EPI frente a modificação na temperatura do forno e pH.

<i>Volum e de injeção</i>	<i>Área</i>	<i>Pratos teóricos</i>	<i>Fator de Cauda</i>	<i>TR (min.)</i>	<i>Pureza do Pico</i>
20 µL	5512701	5944,04	0,96	9,041	1,000

Legenda: TR= Tempo de retenção. Fonte: Dados da pesquisa

Verifica-se ainda no cromatograma acima um pico com tempo de retenção de 2,6 minutos, referente ao tempo morto da coluna, onde é possível o aparecimento de picos relacionados aos solventes utilizados na FM, estando este presente também nos trabalhos anteriores já realizados com a EPI (BARNABÉ 2009; VERAS et al 2013).

4.1.6.2 Validação do método analítico

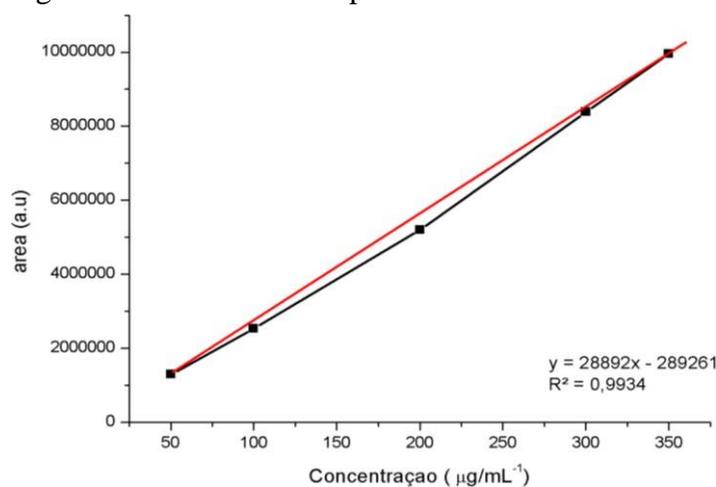
A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer. Se tratando de uma metodologia destinada a um IFA pouco conhecido, tem-se a importância de se obter informações que atestem sua utilização, servindo de base para todos os trabalhos seguintes, de forma eficaz.

Para tal, foram realizados os testes referentes aos parâmetros estabelecidos pela resolução disponibilizada pela ANVISA (RDC 166/2017).

- Linearidade

O procedimento da RDC preconiza a obtenção da curva de calibração com pelo menos cinco pontos, em triplicata (correspondente a três curvas distintas), para a verificação do comportamento linear. Pode-se observar que quanto maior a concentração das amostras, maior a área do pico da EPI, como exposto na figura 19 através da média das três curvas obtidas (Tabela 8), comprovando a linearidade do método e sendo possível a obtenção da equação da reta ($y = 28892x - 289261$) e o valor de $r^2 = 0,9934$. Estando os resultados de acordo com o preconizado pela ANVISA, que determina um valor de r^2 igual ou acima de 0,99 e os valores do Desvio padrão relativo (DRP) até 5%.

Figura 19- Curva obtida a partir da média das amostras.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 8- Valores obtidos para cada curva de calibração, contendo o desvio médio entre cada concentração e o Desvio Relativo Padrão (DRP) em percentual

	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	300 µg/MI	350 µg/mL
curva 1	1259152	2531038	5210360	8701313	10049259
curva 2	1304424	2729706	5178936	8069341	9958238
curva 3	1291058	2525036	5198833	8382740	9488849
Média	1284878	2531038	5198833	8382740	9832115
Desvio	23260,1117	116472,3194	15896,69837	315989,5	300740,8142
DRP %	1,81	4,6	0,30	3,76	3,06

Fonte: Dados da pesquisa

Adicionalmente, foram obtidos os limites de detecção e quantificação, que correspondem à menor concentração capaz de detectar e quantificar a EPI nestas condições (Tabela 9). Pode-se observar uma proximidade nestes valores com o menor ponto da curva, o que não interferiu nos resultados obtidos.

Tabela 9- Características analíticas obtidas pelo método proposto.

<i>Parâmetros</i>	
<i>Intervalo de concentração (µg/mL)</i>	50-350
<i>Equação da reta</i>	$y = 28892x - 289261$
<i>r²</i>	0,9934
<i>Limite detecção</i>	53,61
<i>Limite quantificação</i>	64,73

Fonte: Dados da pesquisa

- **Exatidão**

Determinou-se a exatidão dos resultados analíticos em três diferentes concentrações (menor: 50 µg/mL, intermediária: 200 µg/mL e maior 350 µg/mL), escolhidas em relação a curva de calibração, descrita no item referente a linearidade. Na tabela 10 é possível visualizar os valores de exatidão, DP, DPR%. Para atestar a exatidão de um método analítico, usa-se a comparação entre o resultado de referência e aquele obtido na prática (concentração requerida), permitindo comprovar a proximidade destes valores. Sabendo disso, pode-se constatar que os resultados foram satisfatórios, apresentando o maior valor para exatidão em uma das amostras referentes a concentração intermediária (4,82), mas estando em concordância com o exigido pela resolução 166/2017 que estipula como limite 5%.

Tabela 10- Valores de exatidão para os três níveis de concentrações.

	<i>concentração predita</i>	<i>concentração referência</i>	<i>exatidão (%)</i>
<i>Menor</i>	50,1300	50,0	0,2600
<i>concentração</i>	51,6900	50,0	3,3800

	51,2300	50,0	2,4600
<i>MÉDIA</i>	51,0167		
<i>DP</i>	0,8000		
<i>DPR %</i>	1,5700		
<i>Concentração intermediária</i>	190,3500	200,0	-4,8250
	196,3000	200,0	-1,8500
	196,8700	200,0	-1,5650
<i>MÉDIA</i>	194,5067		
<i>DP</i>	3,61		
<i>DPR %</i>	1,86		
<i>Maior concentração</i>	357,8300	350,0	2,2371
	354,6800	350,0	1,3371
	338,4300	350,0	-3,3057
<i>MÉDIA</i>	350,3133		
<i>DP</i>	10,41		
<i>DPR %</i>	2,97		

Fonte: Dados da pesquisa. DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

- Precisão

A precisão analítica é avaliada a partir da realização de ensaio referentes à repetibilidade e precisão intermediária, que devem expressar a proximidade dos resultados obtidos nas mesmas condições e equipamento, por dois analistas em dias distintos, para contemplar a questão da precisão dos resultados.

A repetibilidade é descrita como a capacidade do método em responder de forma constante à diversas análises, sob as mesmas condições e parâmetros. As amostras foram lidas consecutivamente, em sextuplicata, oriundas de diferentes soluções de trabalho, utilizando a concentração média (CM). Como resultados analíticos (Tabela 11), foram avaliadas as concentrações de EPI, correlacionadas com a área obtidas para a obtenção dos valores de concentração requerida *versus* a de referência. Estando os resultados obtidos de acordo com a resolução (BRASIL, 2017).

Tabela 11- Resultados obtidos para repetibilidade.

	<i>concentração requerida</i>	<i>concentração referência</i>	<i>exatidão %</i>
<i>Repetições da CM.</i>	206,64	200,0	3,3200
	197,86	200,0	-1,0700
	199,40	200,0	-0,3000
	196,35	200,0	-1,8250
	192,44	200,0	-3,7800
	190,01	200,0	-4,9950
	196,8700	200,0	-1,5650
MÉDIA	197,0814		
DP	5,31		
DPR%	2,70		

Fonte: Dados da pesquisa

A precisão intermediária é um parâmetro importante para avaliar a modificação dos resultados analíticos, quando há variação de analista e dias de trabalho. Nesse sentido, a tabela 12 demonstra os resultados obtidos, sendo estes fundamentais para declarar a precisão do método proposto, perante as condições exigidas pela Resolução 166/2017.

Tabela 12- Valores referentes à precisão intermediária.

	DIA 1				DIA 2			
	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2	
	CR	Exatidão	CR	exatidão	CR	Exatidão	CR	exatidão
1	191,35	-4,3250	200,81	0,4078	200,18	0,0940	203,34	1,6715
2	196,70	-1,6500	196,53	-1,7343	195,93	-2,0318	200,51	0,2559
3	191,01	-4,4950	195,11	-2,4422	196,10	-1,9494	200,15	0,0796
4	193,78	-3,1100	198,21	-0,8908	197,86	-1,0674	191,59	-4,2008
5	191,31	-4,3450	199,87	-0,0618	199,40	-0,2956	205,16	2,5818
6	192,44	-3,7800	198,97	-0,5145	189,85	-4,9719	193,45	-3,2746
MEDIA	192,7650		198,2547		196,5926		199,0378	
DP	2,18		2,12		3,63		5,40	
DPR%	1,13		1,07		1,85		2,72	

Fonte: Dados da Pesquisa; CR= Concentração Requerida. DP= Desvio padrão. DPR = Desvio Padrão Relativo.

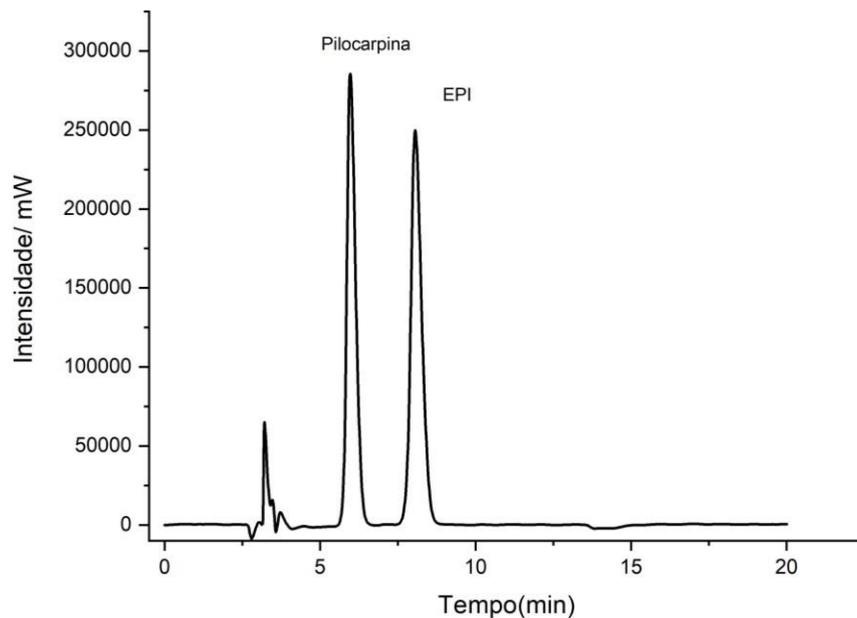
- Seletividade

A seletividade do método analítico é demonstrada pela capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz, de forma clara e inequívoca (BRASIL, 2017).

Como já descrito na etapa de otimização do método, encontra-se na literatura trabalhos que relatam o uso do CLAE para quantificação de EPI e PILO, simultaneamente (BARNABÉ 2009). À título de validação, torna-se pertinente o uso da PILO na avaliação da seletividade pela sua semelhança estrutural com o analito em questão (EPI), usando como principal resposta analítica a pureza cromatográfica do sinal de cada substância analisada.

Desta forma, o cromatograma (figura 20) evidencia os picos característicos das duas amostras, sendo obtida a pureza cromatográfica ($PUREZA_{EPI} = 1,0000$ e $PUREZA_{PILO} = 1,0000$), o que sinaliza a ausência de componentes coelúndos junto com as substâncias analisadas. Os valores de DRP se apresentam dentro do estabelecido pela RDC 166/2017, ($DRP\%_{PILO} = 1,4728$; $DRP\%_{EPI} = 1,0784$). A partir desses resultados, atesta-se a seletividade do método.

Figura 20- Cromatograma com os picos correspondentes à Pilocarpina e Epiisopiloturina.



Fonte: Dados da pesquisa

- Robustez

A robustez avalia a capacidade do método de resistir à pequenas variações para os parâmetros analíticos, como parâmetro de confiabilidade para sua utilização, de acordo com as possíveis modificações nas respostas analíticas. Pode-se alterar diversos parâmetros e foram escolhidos para avaliação neste tópico os descritos na tabela 13.

Tabela 13- Parâmetros avaliados na robustez do método analítico.

<i>Parâmetro</i>	<i>Condição inicial</i>	<i>Condição modificada</i>
<i>Solvente da solução estoque</i>	Metanol	Porção aquosa da FM (pH 3)
<i>Preparação da solução estoque.</i>	Sonicação (10 min)	Agitação simples (10 min)
<i>Fabricante NaOH (preparação da solução-trabalho)</i>	Vetec	Nova química

Fonte: Dados da pesquisa

Dessa forma, podemos constar através da tabela 14 os valores de DRP obtidos pelas médias das amostras analisadas. Sendo este dentro do padrão permitido, sendo considerado o método robusto (BRASIL, 2010).

Tabela 14- Valores dos desvios relativos médios (%) das amostras analisadas, para cada condição modificada.

<i>Condição modificada</i>	<i>DRP %</i>
<i>Porção aquosa da FM (pH 3)</i>	0,83
<i>Agitação simples (10 min)</i>	3,78
<i>Fabricante NaOH (Nova química)</i>	0,42

Fonte: Dados da pesquisa

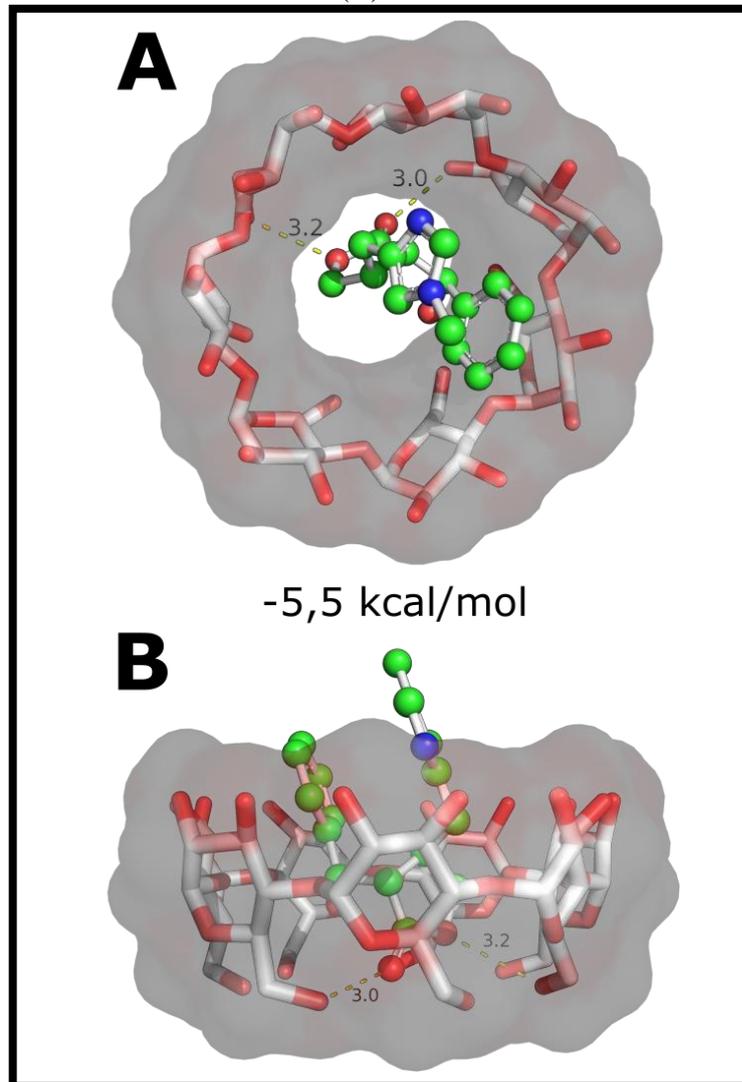
A EPI, apresenta uma baixa solubilidade aquosa, mas foi vista a sua solubilidade em valores de pH baixos. Um dos motivos da utilização de água acidificada na composição de sua FM. Dessa forma, foi avaliada a influência disso na preparação da solução estoque, até então apenas preparada com MeOH. Os resultados cromatográficos foram satisfatórios, apesar das pequenas modificações, estando estas dentro do estabelecido pela RDC 166/2017.

4.2 ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI:BCD E EPI:HPBCD.

Os resultados do estudo de modelagem molecular apontaram a formação de CI onde a molécula *guest* (EPI) se apresentou em duas orientações distintas. A primeira com o anel benzeno paralelo ao anel imidazol (orientação I), e a segunda com os dois anéis posicionados em direções opostas (orientação II).

Para o complexo EPI: β CD a melhor solução de *docking* com energia de -5,5 kcal/mol (orientação I) pode ser observada na Figura 21. A solução é estabilizada por vários contatos hidrofóbicos e por 2 ligações de hidrogênio (3,0 e 3,2 Å).

Figura 21- Melhor solução de docking para o complexo EPI: β CD, visão frontal (A) e lateral (B).



Fonte: Dados da pesquisa

No estudo do complexo EPI:HP β CD a média energética para as 10 melhores soluções de *docking*, considerando orientação I, é de -6,6 kcal/mol. Enquanto a média das 10 melhores soluções para orientação II é de -6,7 kcal/mol, ver tabela 15. A melhor solução para a orientação I é mostrada na figura 22A, com energia de -6,8 kcal/mol, enquanto a melhor solução de *docking* para a orientação II pode ser encontrada na figura 22B, com energia de -6,9 kcal/mol. A melhor solução para a orientação I é estabilizada por vários contatos hidrofóbicos e por 3 ligações de

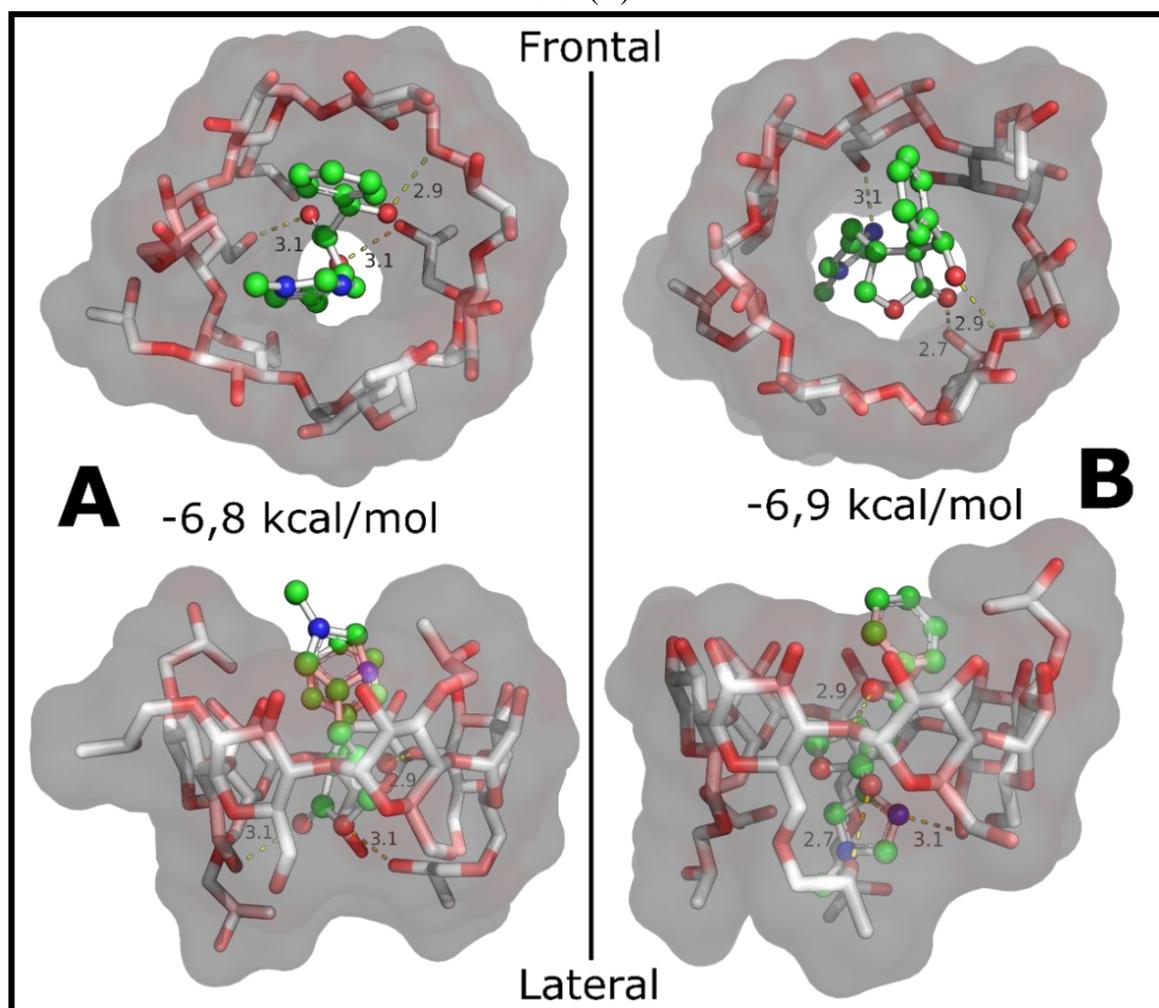
hidrogênio (2,9, 3,1 e 3,1 Å), enquanto a melhor solução para a orientação II também é estabilizada por vários contatos hidrofóbicos e por 3 ligações de hidrogênio (2,7, 2,9 e 3,1 Å).

Tabela 15- Sumário das 10 melhores soluções de docking para o CI EPI:HP β CD nas orientações I e II.

Orientação I	kcal/mol	Orientação II
-6,8	1°	-6,9
-6,8	2°	-6,9
-6,7	3°	-6,8
-6,7	4°	-6,8
-6,6	5°	-6,8
-6,5	6°	-6,7
-6,5	7°	-6,6
-6,4	8°	-6,6
-6,4	9°	-6,6
-6,4	10°	-6,6
-6,6	Média	-6,7

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 22- Melhores soluções de docking para o complexo EPI:HP β CD nas orientações I (A) e II (B).



Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados específicos para o complexo EPI:HP β CD apontam a orientação II (-6,7 kcal/mol) como levemente mais estável que a orientação I (-6,6 kcal/mol). Em virtude da proximidade nos valores de energia de interação para as duas orientações, é provável que a formação do complexo ocorra na mesma proporção para as duas orientações.

Os estudos da modelagem molecular finais apontam o complexo EPI:HP β CD (-6,6 e -6,7 kcal/mol) como mais estável que o complexo EPI: β CD (-5,5 kcal/mol). A presença de uma ligação de hidrogênio a mais, e as interações adicionais entre a EPI e os grupos substituintes HP justificam a maior estabilidade do complexo EPI:HP β CD. Os resultados obtidos nessa etapa do trabalho são de fundamental importância para determinar o tipo de CD utilizada para obtenção dos CIs. De acordo o exposto, opta-se pelo uso da HP β CD para as etapas seguintes.

4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EPI:HP β CD POR DIFERENTES METODOLOGIAS: LIOFILIZAÇÃO, MALAXAGEM E NEBULIZAÇÃO.

Existem vários métodos para a preparação de CI, como por exemplo: liofilização, malaxagem, co-precipitação, atomização, *spray-dryer* (nebulização) e fluidização supercrítica. Dentre estes, o método por liofilização consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução através de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de CIs com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Geralmente, são obtidos pós secos, amorfos e com elevado grau de interação IFA:CD (CAO et al., 2005; VENTURA et al., 2005; RODRIGUEZ-PEREZ et al., 2006; PIRES, 2011).

O processo de obtenção de CI por nebulização consiste em um método de complexação bastante empregado na produção de CI à partir de uma solução. A rápida eliminação de água, observada nessa técnica, proporciona a alta eficiência de complexação além de permitir o controle do tamanho das partículas obtidas. Apesar disso, apresenta alguns limitantes como o estresse térmico aplicado e o baixo rendimento (ADLEY 2008)

Adicionalmente, a malaxagem é um método simples, rápido que também apresenta um elevado rendimento, utilizando uma pequena quantidade de solvente. Tem como principal vantagem a facilidade para transposição de escala, sendo um processo bastante utilizado na indústria farmacêutica, ainda que sua eficiência de complexação seja inferior a apresentada com outras técnicas (MOURÃO, 2012).

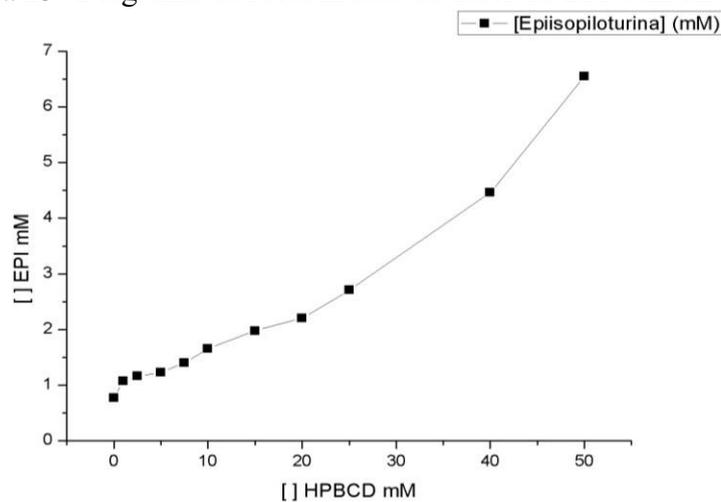
Porém antes de entender qual das técnicas já comentadas mais se adequa e proporciona a obtenção de um CI ideal, é preciso conhecer o comportamento da EPI frente a HP β CD para serem determinadas as proporções e condições de estudo, através de estudos de solubilidade.

4.3.1 Estudo de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases desenvolvido por Higuchi e Connors (1965) é utilizado para verificar o efeito do agente complexante (nesse caso, a HP β CD) sobre o IFA, baseando-se nas alterações na solubilidade do IFA, pela adição de quantidades crescentes de CDs. Mediante a obtenção do gráfico (concentração do IFA *versus* concentração de CD) pode-se então determinar a constante de solubilidade do complexo e indicar sua estequiometria, no estado de equilíbrio (VIEIRA et al 2011).

De acordo com a Figura 23, ocorre um aumento gradativo na solubilidade da EPI em função do aumento da concentração de HP β CD, correspondendo, segundo Higuchi e Connors, ao perfil do tipo A_L, o qual está ligado com a formação de um CI solúvel. Observa-se também o aumento na solubilidade da EPI, que inicialmente era de 220,63 μ g/ml, chegando à 1873,34 μ g/mL na concentração de 50 mM de CD, obtendo um aumento de 849,08 %.

Figura 23- Diagrama de solubilidade de fases da EPI com HP β CD.



Fonte: Dados da pesquisa

Na tabela 16 está expresso o valor da constante de estabilidade ($K_{c1:1}$), tratando-se da formação de um CI estável, já que o valor observado está entre 50 e 2000 M^{-1} (VIEIRA et al. 2015).

Tabela 16- Constante de complexação (Kc 1:1) para o protótipo EPI mais HPβCD.

SISTEMA BINÁRIO	INCLINAÇÃO	INTERCEPTO	Kc 1:1 (M ⁻¹)
EPI:HPβCD	0,00733	0,103513	71,3381

Fonte: Dados da pesquisa

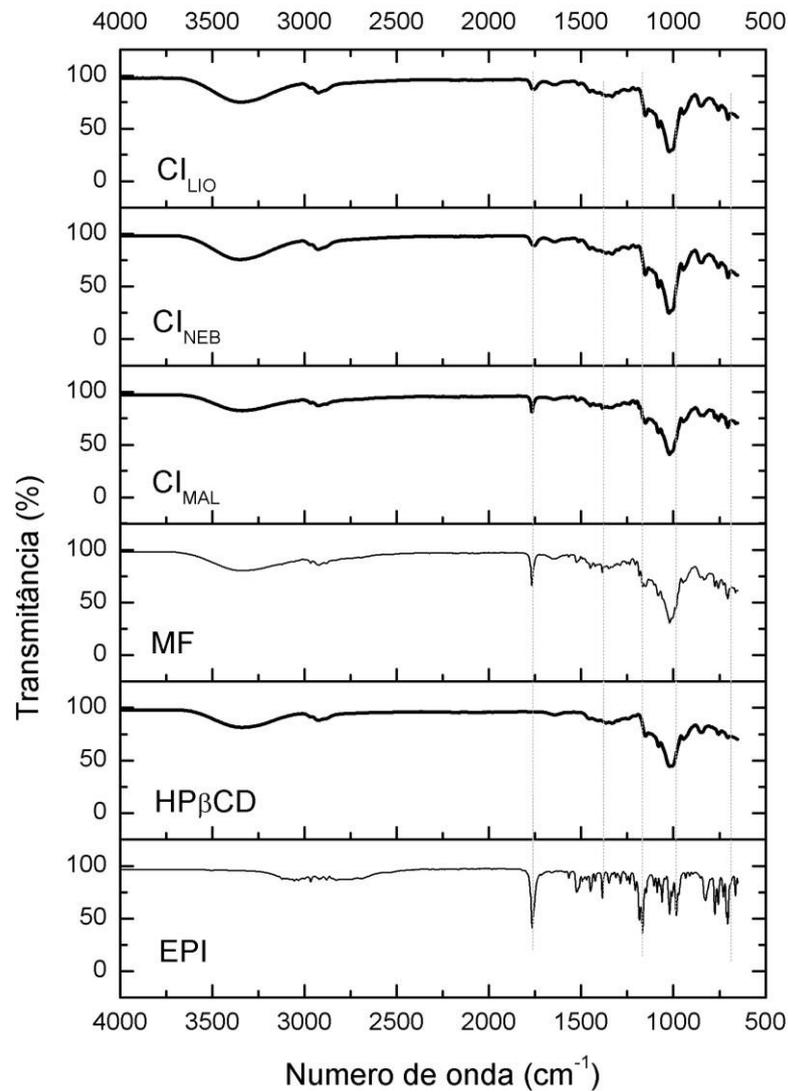
Dessa forma, é evidente o efeito positivo da HPβCD no aumento da solubilidade do protótipo, devido ao seu caráter hidrofílico, justificado pela presença do grupo HP na sua estrutura (PATEL et al., 2018).

4.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier .

A FTIR é fundamental para a caracterização de CIs, pois pode ser utilizada na análise quantitativa de misturas de compostos através da intensidade das bandas características de uma amostra, sendo possível verificar a interação entre duas substâncias através da comparação de seus espectros (BRITTAIN et al., 1991). Eventos como desaparecimento, surgimento ou deslocamento de bandas características fornecem indicativos de interações que podem ser prejudiciais, ou não para o produto formado.

Sabendo disso, na figura 24 é possível visualizar e comparar as bandas dos principais grupos funcionais da EPI, HPβCD, da MF e dos CIs (LIO, MAL e NEB). O espectro da EPI já foi descrito anteriormente, servindo de base para avaliar as alterações frente à presença da CD. A HPβCD apresenta bandas características de absorção 3335 cm⁻¹ que corresponde a vibração de alongamento O-H, em 2926 cm⁻¹ vibrações de estiramento C-H. Na banda 1151 cm⁻¹ e 1080 cm⁻¹ identifica-se as vibrações de alongamento C-H e C-O, respectivamente (JUN et al., 2007; MILETIC et al., 2013; MEDAVERIC et al., 2015).

Figura 24- Espectro de IV-Vis das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CI_{LIO}), nebulizador (CI_{NEB}), malaxado (CI_{MAL}), mistura física (MF), EPI e HP β CD.



Fonte: Dados da pesquisa

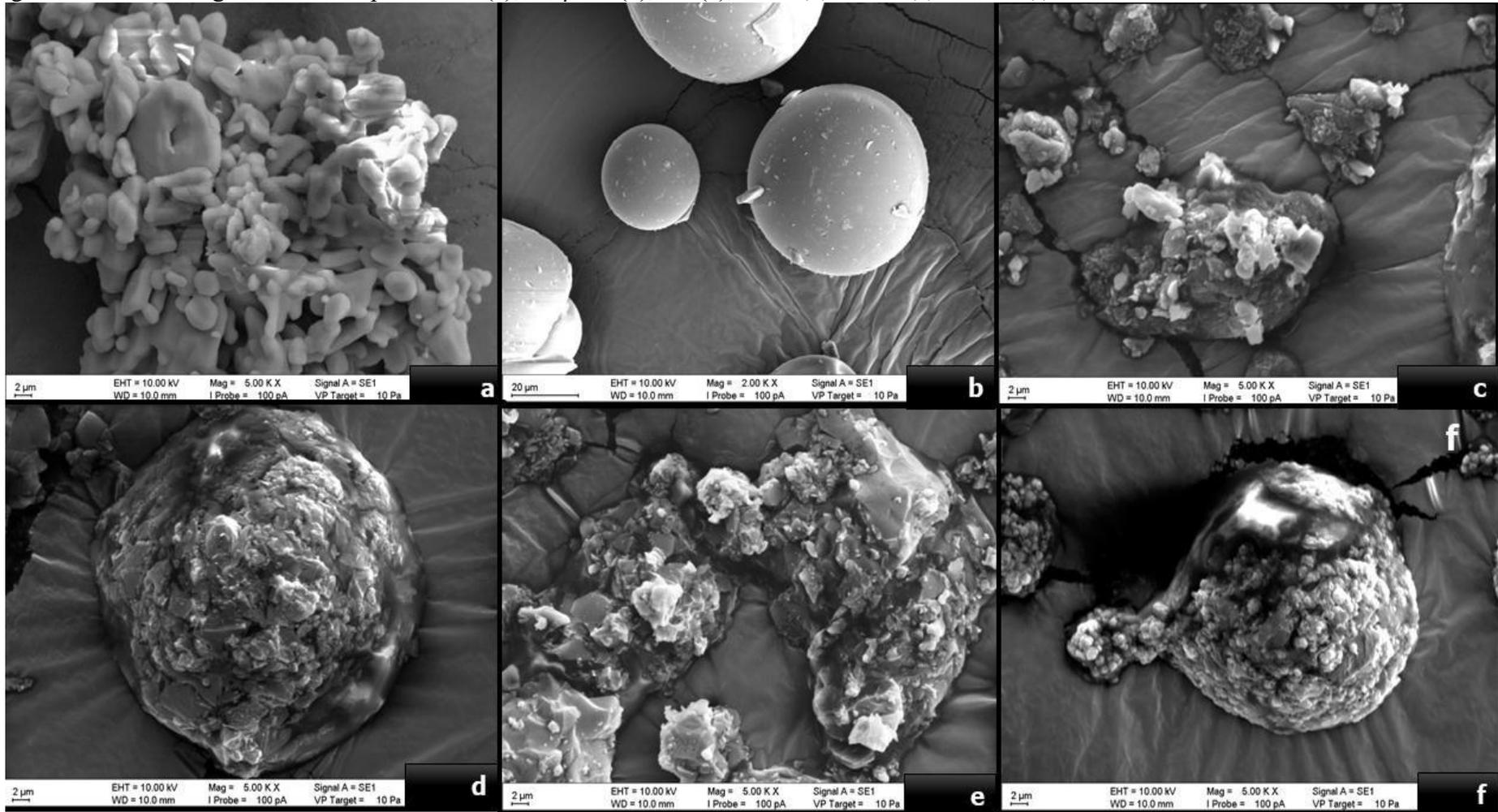
As linhas tracejadas presentes na figura sinalizam as principais modificações observadas nos espectros. Nota-se a sobreposição das bandas da EPI e HP β CD para os CIs obtidos, estando a banda da EPI sinalizada em aproximadamente 1763 cm⁻¹ (referente ao alongamento C=O da lactona) presente em todos, porém com a intensidade bastante reduzida. Adicionalmente, nos demais espaços sinalizados visualiza-se o desaparecimento total ou diminuição das bandas mais expressivas da EPI. Dessa forma, é sugestivo que os métodos de obtenção dos complexos tenham promovido uma interação forte entre a EPI e a CD, indicando uma complexação eficiente. No entanto, é necessário a realização de técnicas complementares, para confirmar tal interação.

4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

Através das Fotomicrografias obtidas (figura 25), visualiza-se os cristais de EPI (29a) distribuídos na forma de aglomerados, com padrões irregulares de tamanho e formatos variados, porém observa-se seu comportamento cristalino.

A HB β CD (25b) se encontra na forma esférica, não apresentando estrutura cristalina devido à sua natureza amorfa. Já a MF (25c) nota-se a presença de cristais de EPI misturados a aglomerados sem forma definida, referente à CD, estando com este aspecto devido ao processo de maceração, sendo este mesmo comportamento evidenciado para o CI_{MAL}(25e) indicando a presença de cristais de EPI ainda livres, resultado de uma complexação incompleta. Já o CI_{LIO} (24d) e CI_{NEB} (25f) apresentam uma forma levemente esférica, não sendo visualizada a presença de aglomerados cristalinos referentes à EPI, sendo indício da amorfização das amostras e uma efetiva complexação. Para uma melhor análise, se faz necessária a investigação com outras técnicas.

Figura 25- Fotomicrografias obtidas para a EPI (a), HB β CD (b), MF(c), Cl_{LIO}(d), Cl_{MAL}(e) e Cl_{NEB} (f)



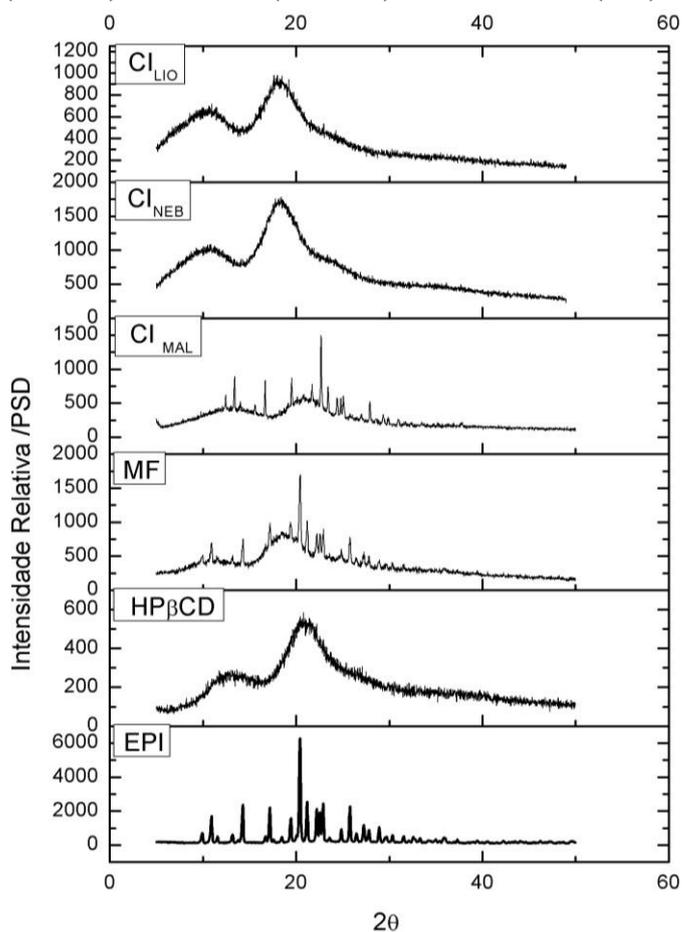
Fonte: Dados da pesquisa

4.3.4 Difração de raios X

A DRX é uma técnica comumente usada para caracterização e identificação de materiais cristalinos, e tem sido amplamente utilizada na caracterização de CDs e CI (na forma de pó ou microcristalinos). A comparação sistemática dos difratogramas de fármacos, MF e CI deve permitir evidenciar mudanças nas propriedades do estado sólido como consequência das interações entre os componentes (MURA, 2015).

Nesse caso, avaliando os difratogramas (Figura 26), a EPI (como já sinalizado anteriormente, referente à sua caracterização) apresenta numerosos picos de difração com alta intensidade e bem definidos, característicos de material cristalino. Tal comportamento também foi observado para a MF e CI_{MAL} com diminuição de intensidade para alguns picos, relacionado à redução no tamanho das partículas durante a preparação da MF e malaxagem do material, respectivamente, o que pode se considerar um indicativo de interação entre os constituintes.

Figura 26- Difratogramas das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CILIO), nebulizador (CINEB), malaxado (CIMAL), mistura física (MF), EPI e HP β CD.



Fonte: Dados da pesquisa

Já para substância amorfa, o comportamento é bastante diferente. A HP β CD apresenta picos amplo e largos relacionados a sua falta de cristalinidade (MICHALSKA et al 2017, e MOKHTAR et al. 2018). Este perfil se repete no difratograma do CI_{LIO} e CI_{NEB}, fornecendo evidências da formação eficiente de CIs (WILLIAMS, MAHAGUNA, SRIWONGJANYA, 1998), pois uma vez que a molécula de EPI está inserida na cavidade da CD, está impossibilitada de interagir com outras moléculas de EPI para formação de sua estrutura cristalina. Desta forma, o produto final apresenta-se completamente amorfo.

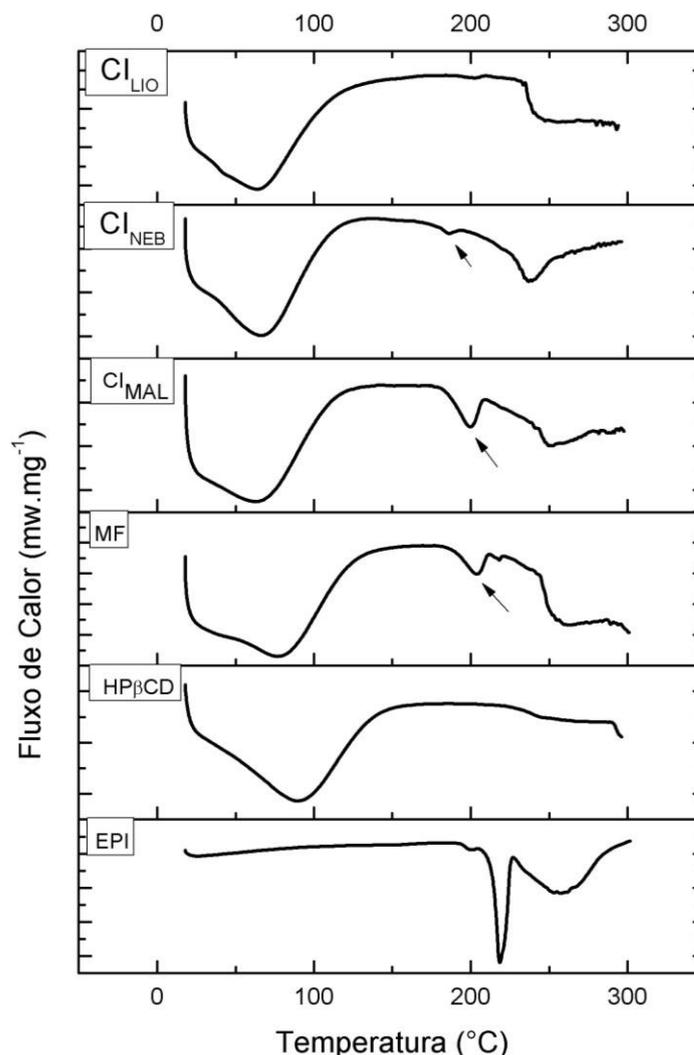
4.3.5 Análise térmica

- Calorimetria Exploratória Diferencial

A DSC é uma ferramenta analítica muito eficiente para a caracterização de CI no estado sólido, devido a sua capacidade de fornecer informações fundamentais para elucidação do processo de complexação. Utilizando como principais parâmetros a mudança da temperatura ou o desaparecimento do evento endotérmico, relacionado à fusão ou sublimação, do componente isolado, como consequência do procedimento utilizado para a preparação e obtenção do CI (MURA,2015; MICHALSKA et al., 2017).

A Figura 27 mostra as curvas térmicas referentes à MF e CIs EPI:HP β CD e da EPI isolada. A HP β CD apresenta apenas um pico endotérmico amplo e assimétrico (entre 124,6-145,15° C), correspondente ao processo de desidratação característico das moléculas de CD em geral, bem como a ausência de um evento de fusão definido por estas não apresentarem uma estrutura cristalina (LIAO et al., 2016; MICHALSKA et al., 2017).

Figura 27- Curvas de DSC das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CI_{LIO}), nebulizador (CI_{NEB}), malaxado (CI_{MAL}), mistura física (MF), sendo comparadas com as amostras de EPI e HP β CD isoladas.



Fonte: Dados da pesquisa

Na curva da MF, nota-se um pico endotérmico largo em torno de 72°C, referente à desidratação da CD. O segundo evento está relacionado à fusão da EPI, sendo evidenciado por um pico largo e menos expressivo. Embora a intensidade do evento tenha sido modificada (diminuída), tal comportamento indica uma interação entre os constituintes, mas que não indica a complexação, compatível com a característica da amostra que é formada por uma simples mistura dos constituintes (MICHALSKA et al., 2017; TRICARICO et al., 2018).

Mura (2015) reforça em seu estudo que a presença residual do pico de fusão de drogas (em curvas térmicas de CI) indica a existência de moléculas de fármaco livre, mesmo no estado cristalino, e sugere uma complexação não inclusiva ou incompleta, como o observado para o CI_{MAL}, apresentando o pico de fusão do fármaco mais evidente, quando comparado ao

do CI_{NEB} . Já para o termograma do CI_{LIO} isto não se observou, sendo o total desaparecimento um forte indicativo de interação entre os componentes sugerindo de forma satisfatória a sua total complexação, devendo ser confirmada após a realização de técnicas complementares (FREITAS et al., 2012; LIU et al., 2014).

Ainda a respeito das curvas DSC dos CI_{MAL} , CI_{NEB} e MF percebe-se uma leve antecipação do evento de fusão do fármaco (exceto para CI_{LIO} por não ser visualizado pico do fármaco), indicando uma possível instabilidade térmica (tabela 17), já que a EPI se fundiria em uma temperatura menor. Sendo necessário a realização de outras técnicas que permitam a correlação dos resultados e sua confirmação, como a TG.

Tabela 17- Valores de T_{onsetF} para as amostras analisadas, com suas respectivas variações, em °C.

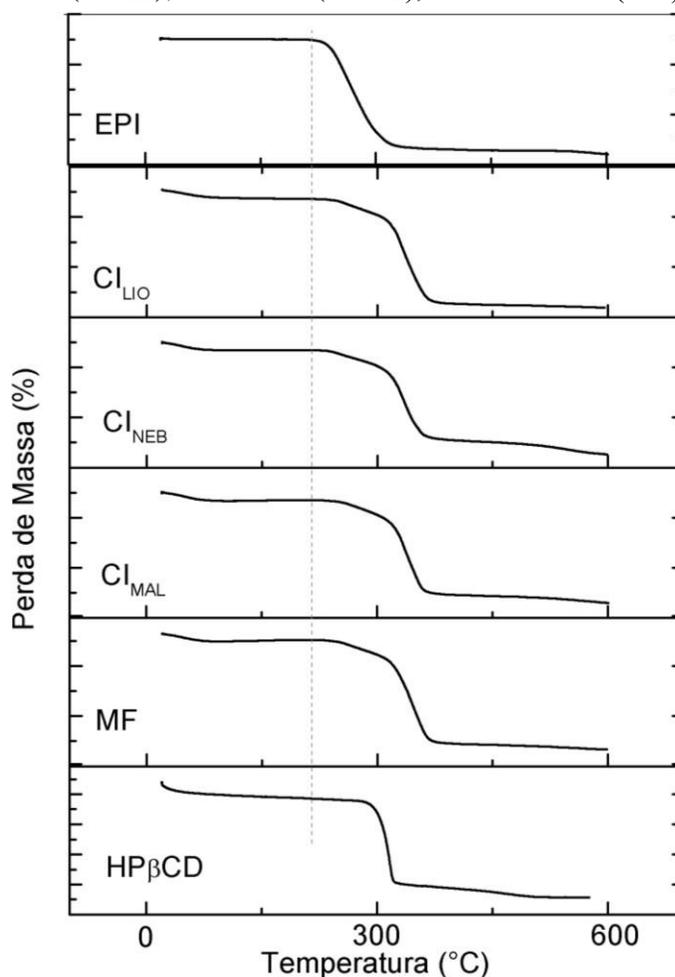
AMOSTRA	T_{ONSETF} (°C)	ΔT_{ONSETF} (°C)
EPI	205,79	----
HPBCD	----	----
MF	187,42	-18,37
CI_{MAL}	180,36	-25,43
CI_{NEB}	177,56	-27,44
CI_{LIO}	----	----

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

- Termogravimetria

A partir da TG (figura 28) é possível verificar os eventos de decomposição de cada amostra, confrontando com o observado para a EPI. Podemos inferir então o retardo significativo na temperatura inicial de degradação do IFA (tabela 18), fenômeno já relatado na literatura que indicam o aumento de estabilidade térmica adquirida pela complexação da EPI na cavidade interna da HP β CD, pois esta protege a molécula hospedeira da ação do calor, suportando temperaturas mais elevadas sem sofrer o processo de degradação. (GARCIA-FERNANDEZ et al., 2013; XU et al., 2014).

Figura 28- Curvas de TG das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CI_{LIO}), nebulizador (CI_{NEB}), malaxado (CI_{MAL}), mistura física (MF), EPI e HP β CD .



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 18- Valores extraídos das Curvas de TG das amostras de complexo de inclusão (EPI: HP β CD) liofilizado (CI_{LIO}), nebulizador (CI_{NEB}) e malaxado (CI_{MAL}) e mistura física (MF).

Amostras	T_{onsetD} (°C)	ΔT_{onsetD} (°C)
<i>Epi</i>	211,57	---
<i>CI_{LIO}</i>	242,18	+30,61
<i>CI_{NEB}</i>	233,89	+22,32
<i>CI_{MAL}</i>	245,09	+33,52
<i>MF</i>	248,01	+36,44

Legenda: T_{onsetD} (Temperatura inicial de degradação); ΔT_{onsetD} (Variação da temperatura inicial de degradação).

O sinal (-) é utilizado para sinalizar uma antecipação da temperatura, em relação a EPI, enquanto o sinal positivo significa um retardo. Fonte: Dados da pesquisa.

Correlacionando os resultados obtidos a partir das curvas DSC, TG e DTG, pode-se inferir que não há indícios de incompatibilidade da EPI quando complexada. Assim, os

eventos indicativos de interação entre os componentes parecem estar mais relacionados à complexação do protótipo na cavidade das CDs.

4.3.6 Estudos de dissolução *in vitro*

O teste de dissolução na indústria farmacêutica tem sido um parâmetro de relevância para o desenvolvimento de fármacos e medicamentos (OL'KHOVICH et al., 2019). Assim, insumos terapêuticos com baixa solubilidade aquosa apresentam desafios tecnológicos durante o desenvolvimento de formas farmacêuticas orais (SUN; LEE, 2015^a).

Uma das formas de melhorar a solubilidade de drogas pouco solúveis é a complexação com ciclodextrinas (MILETIC et al., 2013). A formação de CIs tem capacidade de alterar as propriedades físico-química das drogas. Assim, essa interação pode promover o aumento da molhabilidade, tempo de equilíbrio e estabilidade do IFA, refletindo diretamente na solubilidade do fármaco em solução (FREITAS et al., 2012).

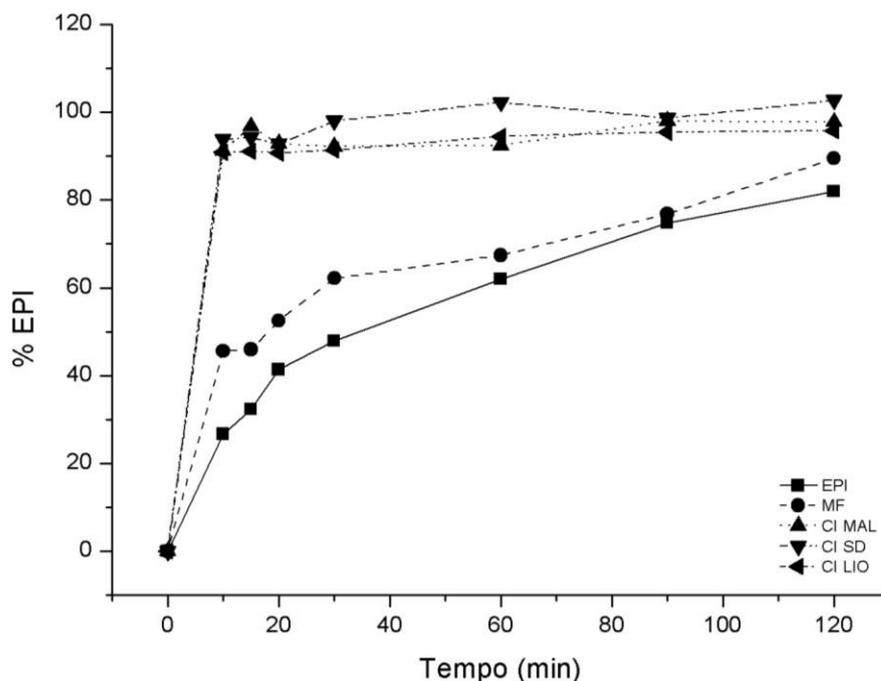
Na tabela 19 é apresentando os percentuais do EPI dissolvido, com e sem a presença da HP β CD, sendo notório o incremento de solubilidade dos CIs, apresentando nos primeiros 10 minutos aproximadamente 90% (CI_{LIO}), 91% (CI_{MAL}) e 94% (CI_{NEB}), de EPI dissolvida frente ao IFA isolado ($\pm 27\%$), figura 29.

Tabela 19- Valores obtidos a partir da dissolução das amostras analisadas.

<i>TEMPO (MIN)</i>	<i>EPI (%)</i>	<i>CI_{MAL} (%)</i>	<i>CI_{NEB} (%)</i>	<i>CI_{LIO} (%)</i>	<i>MF (%)</i>
0	0	0	0	0	0
10	26,62	91,31	93,76	90,86	45,58
15	32,33	96,78	94,24	91,10	45,94
20	41,34	92,85	92,73	90,71	52,53
30	47,89	92,14	98,01	91,42	62,17
60	61,97	92,46	102,21	94,52	67,41
90	74,75	97,97	98,64	95,47	76,86
120	81,94	97,81	102,73	95,82	89,48

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 29- Perfis de dissolução das amostras avaliados quanto ao percentual de EPI dissolvido.



Fonte: Dados da pesquisa.

Adicionalmente, para os três CIs obtidos visualiza-se nos tempos subsequentes que o sistema entrou em equilíbrio entre as moléculas na forma de complexo e das livres no meio de dissolução, sugerindo que o mesmo está na forma de solução (RAMA et al., 2006; KUBOTA, 2010). Tal comportamento pode causar alterações no espectro de absorção de fármacos, deslocamentos ou aumento/diminuição do pico de absorção máximo, que muitas vezes, são similares aos efeitos causados por solventes com diferentes polaridades. Isso sugere que a molécula "hóspede" está sendo transferida de um meio polar para a cavidade apolar das CDs (MELO et al., 2007). Ficando evidente o aumento na taxa de dissolução do sistema, devido à perda de cristalinidade do protótipo na forma de complexo (TANG et al., 2015; DAS et al., 2018).

O incremento de solubilidade da MF justifica-se pela presença da EPI e HP β CD pela simples interação com a HP β CD que reduz a tensão interfacial entre as partículas sólidas e as moléculas de água o que ajuda a aumentar a taxa de dissolução do fármaco (LIAO et al., 2017; TANG et al., 2015; TRICARICO et al., 2018). O mesmo se aplica para o CI_{MAL}, ressaltando que diferente da MF, a malaxagem conta com a presença do solvente que promove a inclusão da EPI na cavidade da CD além de uma maior interação com sua superfície externa, contribuindo para a dissolução do malaxado.

Outra abordagem para a avaliação dos resultados obtidos através dos ensaios de dissolução é a partir do cálculo da área sobre a curva (*AUC*). O aumento do valor da *AUC* está diretamente relacionado a concentração máxima desse fármaco (*in vivo*), sendo o indicativo real de sua melhor biodisponibilidade (YANG et al., 2017).

É possível verificar na tabela 20, o valor de *AUC* obtido para a curva da EPI, MF e dos complexos. Entre os dois CI não é vista uma diferença expressiva entre eles. Neste modelo de avaliação correlaciona-se a concentração de EPI *versus* o tempo. De forma geral, conclui-se que a formação do CI com a HP β CD foi capaz de incrementar a solubilidade para melhor absorção da EPI e conseqüentemente promover um aumento na sua concentração máxima.

Tabela 20- Valores obtidos de *AUC* para amostras analisadas.

Amostra	<i>AUC</i>
EPI	6960,43
MF	7879,72
CI _{LIO}	10782,675
CI _{NEB}	11396,801
CI _{MAL}	10887,998

Fonte: Dados da pesquisa

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a caracterização da EPI foi realizada de forma satisfatória, levando em consideração o somatório de resultados que fornecem informações importantes à respeito de suas características físico-químicas. Sendo possível a confirmação de sua identidade química através da técnica de espectrometria na região do IV e o seu comportamento cristalino visualizado por MEV e DRX.

A partir da análise térmica foi possível evidenciar os eventos de fusão e degradação e a obtenção da cinética de degradação térmica não-isotérmica pelo método de FWO foi aplicável para a determinação de E_a da EPI para as frações de conversão (α) de 40, 50, 60 e 70%, cujos R^2 obtidos foram iguais a 0,99 e de acordo com as modificações realizadas, a partir do método de partida (Avancini et al., 2003) foi possível se obter um método de quantificação dentro dos objetivos pretendidos, permitindo a validação deste de acordo com a resolução 166/2017.

A determinação do perfil de dissolução da EPI evidenciou que a mesma apresenta uma dissolução lenta, apresentando um valor máximo apenas no último tempo de coleta (120 minutos) no qual foi observado um percentual de aproximadamente 82% de EPI dissolvido;

Os estudos *in silico* de modelagem molecular permitiram a observação dos pontos de interação entre a molécula de EPI e as ciclodextrinas utilizadas (β CD e HP β CD), evidenciando a formação de um complexo mais estável com a HP β CD, devido à presença de uma ligação à mais, sendo este tipo de CD utilizado para obtenção de CI por diferentes técnicas (liofilização, malaxagem e nebulização), sendo os resultados satisfatórios e indicativo de uma complexação eficiente, quando somados os resultados das diferentes técnicas, dando destaque aos ensaios de dissolução, onde todos os complexos obtidos apresentaram grande incremento de solubilidade.

Desta forma, tais resultados atendem ao proposto no trabalho, sendo possível a utilização de tais técnicas para o incremento de solubilidade da EPI, podendo este ser incorporada em uma forma farmacêutica de forma segura e eficaz, possibilitando o desenvolvimento de uma nova terapia voltada para doenças negligenciadas.

Como perspectivas futuras para este trabalho, fica a conclusão da validação do método de quantificação por espectroscopia por UV/ Vis e o desenvolvimento e obtenção de formas farmacêuticas sólidas contendo o complexo de inclusão EPI: HP β CD. Tais objetivos compõem um projeto de mestrado, vinculado a este, que ainda se encontra em andamento.

REFERÊNCIAS

- ALEEM, O.; KUCHEKAR, B.; PORE, Y.; LATE, S. Effect of β -cyclodextrin and hydroxypropyl β -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 47, p. 535–540, 2008.
- ANDRADE, J., IHA, K., ROCCO, J.A.F.F., FRANCO, G.P., SUZUKI, N., SUÁREZ-IHA, M.E.V. Determinação dos parâmetros cinéticos de decomposição térmica para propelentes BS e BD. **Ecl. Quím.**, v. 32, n. 3, p. 45-50, 2007.
- ARAÚJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Pós-graduação Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (USP), 2003.
- ARAÚJO, A.A.S.; BEZERRA, M.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determination of the melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. **Brazilian journal of pharmaceutical Science**, v. 46, n. 1, p. 37-43, 2010.
- ASTRAY, G.; GONZALES BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL OTERO, R., IMALGANDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**., v. 23, n. 7, p. 1631–1640, 2009.
- AULTON, M.E., TAYLOR, K.M.G. Delineamento de formas farmacêuticas. 4ª Ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2016.
- AVANCINI, G., ABREU, I.N.; SALDAÑA, M.D.A.; NOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**., v. 63, p. 171–175, 2003.
- AZIMI H.R., REZAEI. M., MAJIDI, F. The non-isothermal degradation kinetics of St–MMA copolymers. **Polymer Degradation and Stability**., v. 99, p. 240-248, 2014.
- BANETH, G., SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 315–24, 2002.
- BARNABÉ, E.C. **Extração de pilocarpina e epiisopiloturina de jaborandi utilizando processos envolvendo solventes supercríticos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos). Pós graduação em Engenharia química. Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- BARREIRO, E.; RODRIGUES, C.R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997.

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

BIANCHI, O., CASTEL, C., OLIVEIRA, R.V.B., BERTUOLI, P.T., HILLIG, E. Avaliação da Degradação Não-Isotérmica de Madeira Através de Termogravimetria-TGA. **Polimeros**, v. 20, p. 395-400, 2010.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária . **Farmacopéia Brasileira**, 5 ed., Brasília, v. 2, p.1109, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC No 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. 2017, p. 22, 2017.

BRASIL. **Casos de leishmaniose caem no País, mas doença ainda requer atenção**. Governo do Brasil. Acesso em: <<http://www.brasil.gov.br/>>. 21 de novembro de 2017.

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

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

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

CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Dev Ind Pharm**; v. 31, n.8. p. 747-56, 2005.

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

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

CHAPMAN, N., ABELA-OVERSTEEGEN, LISETTE., DOUBELL, A., Chowdhary, V., Gurjav, U., MING, O. neglected disease research and development: a pivotal moment for global health. **Policy Cures Research**. 2016.

- CHEN, M.; ZHANG, W.; JIANG, R.; DIAO, G. Development of glucose amperometric biosensor based on a novel attractive enzyme immobilization matrix: Amino derivative of thiacalixarene. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n. 2, p. 177–183, 2011.
- CLEMENTE, M., ROCHA, R.J., IHA, K., ROCCO, J.A.F.F. Desenvolvimento de tecnologia de pré-polímeros na síntese de poliuretanos empregados em combustíveis sólidos. **Quim. Nova**, v. 37, n. 6, p. 982-988, 2014.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasil, 123 - 129, 1984.
- COSTA, O.V. **Multiplicidade estrutural no paracetamol no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em gestão, pesquisa e desenvolvimento em tecnologia farmacêutica). Programa de pós-graduação em gestão, pesquisa e desenvolvimento em tecnologia farmacêutica, Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, 2009.
- COSTA, R.S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará, 2010.
- COSTA, S.P.M.; SILVA, K.E.R.; MEDEIROS, G.C.R.; ROLIM, L.A.; OLIVEIRA, J.F.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; NETO-ROLIM, P.J. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, v. 562, p. 29–34, 2013.
- CUFFINI, S.L.; ELLENA, J.F.; MASCARENHAS Y.P.; AYALA, A.P.; SIELSER, H.W.; MENDES FILHO, J.; MONTI, G.A.; AIASSA, V.; SPERANDEO, N.R. Physicochemical characterization of deflazacort: Thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, p. 261–269, 2007.
- DAVIS, M. E., BREWSTER, M. E. Cyclodextrin, based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p. 1023–1035, 2004.
- DE MELO, N.F.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L. F. Interaction between nitroheterocyclic compounds with β -cyclodextrins: phase solubility and HPLC studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V.47, p. 865–869, 2008.
- DEDAVID, B.A., GOMES, C.I., MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura microscopia eletrônica de varredura Aplicações e preparação de amostras. **Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EDIPUCRS, ISBN: 978-85-7430-702-2. Porto Alegre, 2007.
- DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1033–1046, 2004.
- DEORSOLA, A.C.; MOTHÉ, C.G.; OLIVEIRA, L.G.; DEORSOLA, A.B. Technological monitoring of cyclodextrin e World panorama. **World Patent Information**. p. 1-9. doi:10.1016/j.wpi.2014.06.004, 2014.
- DIAS, L.C., DESSOY, M.A. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p.1552-1556, 2013.

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

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2010.

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

FERES, M.V.C., CUCO, P.H.O., SILVA, P.A. Cooperação internacional e organizações não governamentais: releitura do papel institucional no combate às doenças negligenciadas. **SCIENTIA IURIS**, v.19, n.2, p.181-198, 2015.

FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R.; SILVA, F.C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

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

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

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

GELDENHUYS, W. J.; GAASCH, K. E.; WATSON, M.; ALLEN, D. D.; VAN DER SCHYF, C.J. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 11, n. 3-4, p. 127-132, 2006.

GHADERI, F., NEMATI, M., SIAHI-SHADBAD, M.R., VALIZADEH, H.H., MONAJJEMZADEH, F. Physicochemical evaluation and non-isothermal kinetic study of the drug–excipient interaction between doxepin and lactose. *Powder Technology*. V. 286, p. 845-855, 2015.

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

GUIDO, R.V.C., ANDRICOPULO, A.D. Modelagem molecular de fármacos. Revista processos químicos, 2008.

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

GUIMARÃES, M.A.; OLIVEIRA, R.N.; VÉRAS, L.M .C.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D. M.; CAMPOS, S. A.; ET AL. Anthelmintic Activity *in vivo* of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **Journal PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. 7–18, mar. 2015.

HIGUCHI, T; CONNORS, K, A. Phase solubility techniques **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v.4, p.117-212, 1965.

HOTEZ PJ, FENWICK A, SAVIOLI L, MOLYNEUX DH (2009) Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet* 373: 1570–1575. 54, 2009.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's Neglected Tropical Diseases: An Overview and a Report Card. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.

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

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

IBGE, 2017. Acessado em:< <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/2013-agencia-de-noticias/releases/16981-pevs-2016-producao-da-silvicultura-e-da-extracao-vegetal-alcanca-18-5-bilhoes.html>>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

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

JAKOBSEN PH, WANG M-W, NWAKA S (2011) Innovative Partnerships for Drug Discovery against Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, n. 9, 2011.

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

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

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

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

KUBOTA, D. **Estudo físico-químico do complexo de inclusão do fármaco trimetropim com a β -ciclodextrina aleatoriamente metilada.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. P. 42, 2010.

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

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

LAFFLEUR, F., RÖTTGES, S. Buccal adhesive chitosan conjugate comprising pilocarpine for xerostomia. *International Journal of Biological Macromolecules* 135, 1043–1051, 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MELO, C. M.; VIEIRA, A. C. Q. M.; NASCIMENTO, A. L. S.; FIGUEIRÊDO, C. B. M.; ROLIM, L. A.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; VERAS, L. M. C.; LEITE, J. R. S. A.; ROLIM NETO, P. J.; SOARES, M. F. L. R. A compatibility study of the prototype epiisopiloturine and pharmaceutical excipients aiming at the attainment of solid pharmaceutical forms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 120, n. 1, p. 689–697, 2014.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; MORAES, C.M.; BRITO, C.L.; TROSSINI, G.H.G.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxilpropil- β -ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.35-44, 2007.

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

MICHALSKA, P.; WOJNICZ, A.; RUIZ-NUÑO, A.; ABRIL, S.; BUENDIA, I.; LEÓN (Dr.), R. Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physical characterization and pharmacological effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 94-104, 2017.

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

MONTANARI, C.A., BOLZANI, V.S. PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 105-111, 2001.

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

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226-238, fev. 2015.

NANDA, A., SAHOO, R.N., PRAMANIK, A., MOHAPATRA, R., PRADHAN, S.K., THIRUMURUGAN, A., DAS, D., MALLICK, S. Drug-in-mucoadhesive type film for ocular anti-inflammatory potential of amlodipine: Effect of sulphobutyl-ether-beta-cyclodextrin on permeation and molecular docking characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 172, n. 1, p. 555-564. 2018.

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

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

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

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

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

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

PINHEIRO, C.U.B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Staph ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brazil. *Acta Bot Brasil* 16:141–150, 2002.

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

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

RABELLO, M. M., ROLIM, L. A., **ROLIM-NETO, P. J.**, HERNADES, M. Z. CycloMolder software: building theoretical cyclodextrin derivatives models and evaluating their host:guest

interactions. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry (online)*, p. 301-308, 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SANTOS, C.M., MORAIS, L.C. Parâmetros termodinâmicos da casca de laranja desidratada. *Quim. Nova*, v. 38, n. 4, p. 488-492, 2015.

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

SAWAYA, A.C.H.F; ABREU, I.N; ANDREAZZA, N.L; EBERLIN, M.N. MAZZAFERA, P. Pilocarpine and related alkaloids in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). In: Cassiano NM (ed) Alkaloids: properties, applications and pharmacological effects. *Nova Science Publishers*, p 63–80, 2010.

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

SILVA, C. V. N. S., BARBOSA, J. A. P., FERRAZ, M. S., SILVA, N. H., HONDA, N. K., RABELLO, M. M., ... SANTOS-MAGALHÃES, N. S.. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP- β -CD inclusion complex encapsulated in microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, n. 5, p. 494–503, 2016.

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

SILVA-PIRES, F.E.S.; BONATTO, M.P.O., MELLO, M.L.C.M TRAJANO, V.S. ARAÚJO-JORGA, T.C. As doenças negligenciadas e os determinantes sociais da saúde no contexto da investigação em ensino. **Revista de Educação, Ciência e Cultura, Canoas**, v. 22, n. 1, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

SYKULA-ZAJA, A.; LODUGA-CHRUSCINSKA, E.; PALECZ, B.; DINNEBIER, R. E.; GRIESSER, U. J.; NIEDERWANGER, V. Thermal and X-ray analysis of racemic

bupivacaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 105, p. 1031–1036, 2011.

TANG, P., LI, S., WANG, L., YANG, H. YAN, J. LI, H. Inclusion complexes of Chlorzoxazone with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 297–305, 2015.

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

TREIB, J., BARON, J. F., GRAUER, M. T., STRAUSS, R. G.. An international view of hydroxyethyl starches. **Intensive Care Medicine**, v. 25, p. 258–68, 1999.

TRICARICO, D.; MAQOUD, F.; CURCI, A.; CAMERINO, G.; ZIZZO, N.; DENORA, N.; CUTRIGNELLI, A.; LAQUINTANA, V.; LOPALCO, A.; FORGIA, F.L.; FONTANA, S.; FRANCO, S.; LOPEDOTA, A. Characterization of minoxidil/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in aqueous gel useful for alopecia management: Efficacy evaluation in male rat. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 122, p. 146-157, 2018.

TROTT, O., OLSON, A. J. AUTODOCK VINA: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–61, 2010.

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

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

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

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

VIEIRA, A. C. C. **Obtenção e caracterização de complexo de inclusão e sistema multicomponentes no incremento da solubilidade do efavirenz na terapia ANTI-HIV.**

Dissertação (Programa de inovação terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

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

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

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

WENZ, G.. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 33, p. 803–822.

<https://doi.org/10.1002/anie.199408031>, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. ISBN 978-92-4-156544-8, 2017.

XAVIER-JUNIOR, F. H., RABELLO, M. M., HERNANDES, M. Z., DIAS, M. E. S., ANDRADA, O. H. M. S., BEZERRA, B. P., SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Supramolecular interactions between β -lapachone with cyclodextrins studied using isothermal titration calorimetry and molecular modeling. **Journal of Molecular Recognition**, p. 1–10, 2017.

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

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

YANG, Y., GAO, J., MA, X., HUANG, G. Inclusion complex of tamibarotene with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, characterization, in-vitro and in-vivo evaluation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, V. 12, p. 187–192, 2017.

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

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

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

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

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